



SKRIPSI – TK141581

**PRODUKSI GULA REDUKSI DENGAN HIDROLISIS
SABUT KELAPA HASIL PRETREATMENT ALKALI
MENGUNAKAN CRUDE ENZIM TERIMOBILISASI**

Oleh:

Gek Ela Kumala Parwita

NRP. 2311100005

Dwi Ramadhani Tardan

NRP. 2311100183

Dosen Pembimbing:

Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng.

NIP. 1966 05 23 1991 02 1001

**JURUSAN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2016**



FINAL RESEARCH PROJECT – TK141581

**REDUCING SUGAR PRODUCTION FROM COCONUT
HUSK THROUGH ALKALINE PRETREATMENT AND
ENZYMATIC HYDROLYSIS BY USING IMMOBILIZED
ENZYME**

By:

Gek Ela Kumala Parwita

NRP. 2311100005

Dwi Ramadhani Tardan

NRP. 2311100183

Advisor:

Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng.

NIP. 1966 05 23 1991 02 1001

**CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY
SURABAYA 2016**

LEMBAR PENGESAHAN

PRODUKSI GULA REDUKSI DENGAN HIDROLISIS SABUT KELAPA HASIL PRETREATMENT ALKALI MENGUNAKAN CRUDE ENZIM TERIMOBILISASI





Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
Sarjana Teknik pada Program Studi S-1 Jurusan Teknik Kimia
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh :

Gek Ela Kumala Parwita
Dwi Ramadhani Tardan

NRP : 2311 100 005
NRP : 2311 100 183

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir :

1. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng  (Pembimbing I)
2. Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng  (Penguji I)
3. Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D  (Penguji II)
4. Juwari S.T., M.Eng., Ph.D  (Penguji III)



Surabaya

Januari, 2016

PRODUKSI GULA REDUKSI DENGAN HIDROLISIS SABUT KELAPA HASIL PRETREATMENT ALKALI MENGUNAKAN CRUDE ENZIM TERIMOBILISASI

Nama Mahasiswa : 1. Gek Ela Kumala P (2311 100 005)
2. Dwi Ramadhani (2311 100 183)
Jurusan : Teknik Kimia
Dosen : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng

ABSTRAK

Kebutuhan energi saat ini semakin meningkat sementara persediaan energi dari bahan bakar fosil jumlahnya sangat terbatas. Oleh karena itu diperlukan untuk membangun sumber energi alternatif yang dapat terbarukan serta ramah lingkungan. Pencarian akan sumber bahan bakar alternatif semakin berkembang salah satunya adalah biofuel. Limbah sabut kelapa merupakan salah satu agrikultur di Indonesia yang jumlahnya sangat melimpah. Hidrolisis dari limbah sabut kelapa dapat memproduksi gula reduksi yang kemudian dapat diproses hingga menjadi biofuel. Hidrolisis yang dilakukan untuk memperoleh gula reduksi dari sabut kelapa merupakan hidrolisis enzimatik. Akan tetapi proses memakan biaya yang sangat besar karena adanya keterbatasan dan mahal nya harga dari enzim. Oleh karena itu, untuk dapat mengantisipasi permasalahan ini, maka perlu dilakukan imobilisasi enzim. Strategi dari imobilisasi enzim sendiri adalah dengan mengikatkan enzim pada carrier agar kemudian setelah proses reaksi enzim dapat dipisahkan dengan mudah dari produk dan digunakan kembali. Metode imobilisasi enzim pada penelitian yang kami lakukan yakni imobilisasi enzim selulase dengan chitosan dan imobilisasi enzim selulase dengan chitosan-glutaric dialdehyde(1%) yang

dilakukan pada tekanan 1 atm, suhu 25°C, dan pH 3. Dari metode imobilisasi enzim ini didapatkan produk (a) enzim selulase terimobilisasi dengan chitosan (b) enzim selulase terimobilisasi dengan chitosan-glutaricdialdehyde(1%). Dimana produk enzim terimobilisasi digunakan pada proses hidrolisis enzimatik dari sabut kelapa, enzim tanpa imobilisasi dan enzim dengan purifikasi juga digunakan pada proses hidrolisis enzimatik yang kemudian hasil dari hidrolisisnya dibandingkan. Jumlah protein selulase terimobilisasi dianalisis dengan metode Bradford dan hasil gula reduksi dari proses hidrolisis dianalisis dengan analisa DNS. Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa enzim crude selulase mampu menghidrolisis sabut kelapa menjadi gula reduksi .Hasil analisa gula reduksi terbaik ditunjukkan pada variabel enzim crude yang dimurnikan dengan amonium sulfat dengan masa gula reduksi sebesar 0,148 gram dan yield 0,251 gram gula reduksi per gram hemiselulosa+selulosa. Hasil terbaik kedua ditunjukkan oleh variabel enzim crude selulase yakni dengan masa gula reduksi 0,103 gram dan yield 0,176 gram gula reduksi per gram hemiselulosa+selulosa. Hasil terbaik ketiga ditunjukkan oleh variabel enzim crude selulase terimobilisasi chitosan-GDA dengan masa gula reduksi 0,033 gram dan yield 0,057 gram gula reduksi per gram hemiselulosa+selulosa dan hasil terendah ditunjukkan oleh variabel enzim crude selulase terimobilisasi chitosan dengan masa gula reduksi 0,021 gram dan yield 0,035 gram gula reduksi per gram hemiselulosa+selulosa.

Kata kunci: imobilisasi; sabut kelapa; gula reduksi; lignoselulosa; chitosan; glutaricdialdehyde;

REDUCING SUGAR PRODUCTION FROM COCONUT HUSK THROUGH ALKALINE PRETREATMENT AND ENZYMATIC HYDROLYSIS BY USING IMMOBILIZED ENZYME

Name : 1. Gek Ela Kumala P (2311 100 005)
2. Dwi Ramadhani (2311 100 183)
Department : Chemical Engineering
Advisor : Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M. Eng

ABSTRACT

Nowadays, the energy needs are increasing while energy supplies from fossil fuel are limited. So that, there is an urgent need to develop alternative sustainable energy resources and also environmentally friendly. The alternative energy resources research are evolving, one of them is biofuel. Coconut husk waste is one of the most abundant agriculture in Indonesia. Hydrolysis of coconut husk waste can produce reducing sugar which can be further processed to create biofuel. This process called enzymatic hydrolysis. However, this process is high cost since enzyme is usually limited and expensive. In order to solve this problem, immobilization process is needed. The strategy for immobilization itself is to fix the enzyme on solid support so then after reaction, it can be easily recovered and reused. The immobilization methods on this research are immobilization cellulase with chitosan and immobilization cellulase with chitosan-glutaricdialdehyde(1%) which carried out at pressure of 1 atm, temperature 25°C, and pH 7. The results from these immobilization processes were (a) immobilized cellulase with chitosan (b) immobilized cellulase with chitosan-glutaricdialdehyde(1%) respectively. These products were used to enzymatic hydrolysis process from coconut husk. The free enzyme and the free purification enzyme were also used in hydrolysis process. Then the results from these processes were compared. Amount of immobilized cellulase's protein were analyzed by using Bradford's method and the reducing sugar from

hydrolysis process were analyzed by using DNS analysis. It was found that the highest mass of reducing sugar produced was 0.148 gram with reducing sugar yield 0.251 gram/(hemicellulose + cellulose) which was obtained by purification of crude selulase enzyme. The second highest mass of reducing sugar produced was 0.103 gram with reducing sugar yield 0.176 gram/(hemicellulose + cellulose) which was obtained by crude selulase enzyme. The third highest mass of reducing sugar produced was 0.033 gram with reducing sugar yield 0.057 gram/(hemicellulose + cellulose) which was obtained by immobilized enzyme with chitosan-GDA and the lowest mass of reducing sugar produced was found to be 0.021 gram with reducing sugar yield 0.035 gram/(hemicellulose + cellulose) which was obtained by immobilized enzyme with chitosan, respectively.

Keywords: immobilization; coconut husk; reducing sugar; lignocellulose; chitosan; glutaricdialdehyde;

KATA PENGANTAR

Puii syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan rahmat-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan skripsi dengan judul:

PRODUKSI GULA REDUKSI DENGAN HIDROLISIS SABUT KELAPA HASIL PRETREATMENT ALKALI MENGGUNAKAN CRUDE ENZIM TERIMOBILISASI

Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar kesarjanaan di Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Tiada kata yang paling banyak kami ucapkan kecuali terima kasih untuk semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini. Dalam kesempatan ini kami tidak lupa mengucapkan terima kasih kepada :

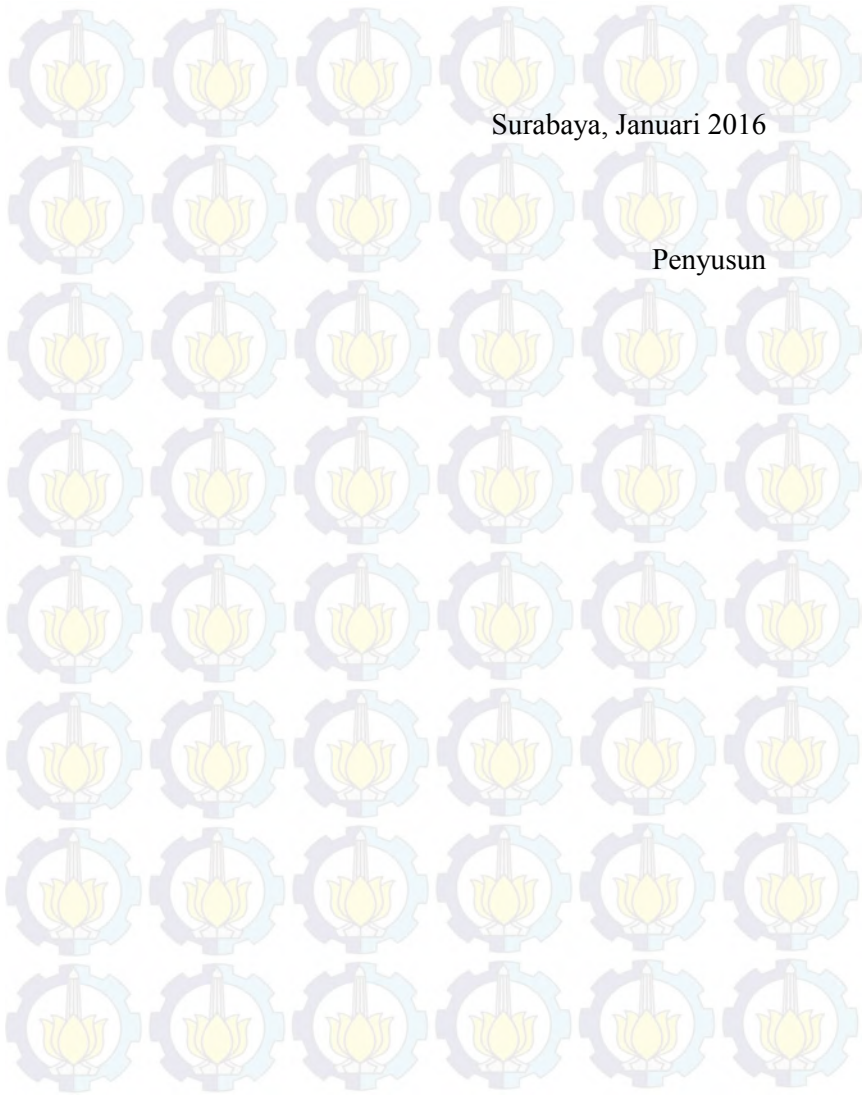
1. Bapak Juwari, S.T., M.Eng., Ph.D selaku Ketua Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng, selaku dosen pembimbing serta Kepala Laboratorium Teknologi Biokimia yang telah memberikan waktu, tenaga, perhatian, masukan dan bimbingan selama proses pembuatan skripsi ini.
3. Dosen penguji Bapak Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng, Bapak Juwari Purwo Sutikno, S.T., M.Eng., Ph.D, dan Bapak Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D atas saran dan masukannya.
4. Orang tua dan keluarga dirumah yang telah banyak memberikan dukungan moral spiritual dan material.
5. Teman-teman di laboratorium Teknologi Biokimia terima kasih untuk kerja sama dan dukungan yang telah diberikan.
6. Bapak Mukti Utomo serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu yang telah turut membantu demi kelancaran kelancaran penyelesaian skripsi ini.

Kami menyadari bahwa laporan ini banyak kekurangan, sehingga saran dan kritik yang membangun

sangat kami perlukan. Semoga laporan Skripsi ini dapat bermanfaat bagi semuanya.

Surabaya, Januari 2016

Penyusun



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
ABSTRAK	i
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Batasan Masalah	4
I.4 Tujuan Penelitian	4
I.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Sabut Kelapa (<i>Coconut Husk</i>)	7
II.2 Lignoselulosa	8
II.3 Pretreatment Alkali	12
II.4 Enzim Selulase	12
II.5 <i>Chitosan</i>	14
II.6 Imobilisasi	18
II.7 Hidrolisis Enzimatik	26
II.8 Pemurnian Enzim	27
II.9 Uji Bradford	29
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
III.1 Tempat dan Waktu Penelitian	31
III.2 Variabel Penelitian	31
III.3 Bahan dan Alat	31
III.3.1 Bahan Penelitian	31
III.3.2 Alat Penelitian	32
III.4 Tahapan Metode Penelitian	32
III.4.1 Pretreatment Sabut Kelapa	32

III.4.1.1 <i>Pretreatment</i> Mekanik	32
III.4.1.2 <i>Pretreatment</i> Kimia (NaOH 1%w/v).....	32
III.4.2 Analisa Kadar Selulosa, Hemiselulosa, lignin	33
III.4.3 Produksi Crude Enzim Selulase dari <i>A.niger</i>	34
III.4.3.1 Tahap Persiapan Crude Enzim	34
III.4.3.2 Tahap Produksi Crude Enzim	36
III.4.3.3 Pemurnian dengan Ammonium Sulfat.....	37
III.4.4 Persiapan Uji Aktivitas Enzim	39
III.4.4.1 Pembuatan Larutan DNS	39
III.4.4.2 Pembuatan Larutan CMC.....	39
III.4.4.3 Pembuatan Kurva Standar Glukosa.....	39
III.4.5 Uji Aktifitas Enzim Selulase.....	40
III.4.5.1 Uji Aktifitas Enzim Selulase Sebelum Koreksi.....	40
III.4.5.2 Uji Aktifitas Larutan Koreksi Enzim Selulase	41
III.4.6 Modifikasi Chitosan dan Imobilisasi Enzim.....	41
III.4.6.1 Tahap Persiapan Glutaricdialdehyde.....	41
III.4.6.2 Imobilisasai Enzim dengan Chitosan	42
III.4.6.3 Imobilisasai Enzim dengan Chitosan-GDA.....	42

III.4.7 Uji Analisa Enzim Terimobilisasi	42
III.4.7.1 Persiapan Uji	
Analisa Bradford	42
III.4.7.2 Prosedur Pembuatan	
Larutan Standar	
Protein	42
III.4.7.3 Analisa Enzim	
Metode Bradford	42
III.4.8 Proses Hidrolisis Sabut Kelapa	43
III.4.8.1 Pembuatan Kurva	
Standar Glukosa	
Hidrolisis	43
III.4.8.2 Prosedur Hidrolisis	
Enzim Terimobilisasi	44
III.4.9 Analisa Kadar Glukosa	45
III.4.9.1 Analisa Kadar	
Glukosa Dengan	
Metode DNS	45
III.5 Kondisi Operasi Penelitian	46
III.6 Diagram Alir Penelitian	47
III.6.1 Diagram Metodologi Keseluruhan	47
III.6.2 Diagram Alir <i>Pretreatment</i>	
Bahan Baku	48
III.6.3 Diagram Alir Tahap	
Produksi <i>Crude Enzyme</i>	49
III.6.4 Diagram Alir Tahap	
Pemurnian Amonium Sulfat	50
III.6.5 Diagram Alir Tahap	
Imobilisasi <i>Enzyme</i> Chitosan	51
III.6.6 Diagram Alir Tahap	
Imobilisasi <i>Enzyme</i>	
Chitosan-GDA	52
III.6.6.1 Diagram Alir	
Tahap Persiapan	
Material Pendukung	

Chitosan-GDA	52
III.6.6.2 Diagram Alir Tahap Imobilisasi Enzim dengan Chitosan-GDA.....	53
III.6.7 Diagram Alir Tahap Hidrolisis Selulosa dan Hemiselulosa.....	54
III.6.8 Diagram Alir Tahap Uji Konsentrasi Gula Reduksi.....	55
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
IV.1 Pretreatment Sabut Kelapa	57
IV.1.1 Perbandingan Komposisi Kimia Sabut Kelapa SebelumDan Sesudah Pretreatment.....	59
IV.2 Produksi Enzim Selulase dari <i>A.niger</i>	60
IV.2.1 Tahap Pengujian Aktivitas dan Protein Enzim	62
IV.3 Pemurnian Enzim dengan Ammonium Sulfat	69
IV.4 Imobilisasi Enzim	73
IV.4.1 Imobilisasi Enzim dengan Chitosan	73
IV.4.2 Imobilisasi Enzim dengan Chitosan-GDA	78
IV.5 Hidrolisis Sabut Kelapa	85
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
V.1 Kesimpulan	107
V.2 Saran	107
DAFTAR PUSTAKA	
APENDIKS	

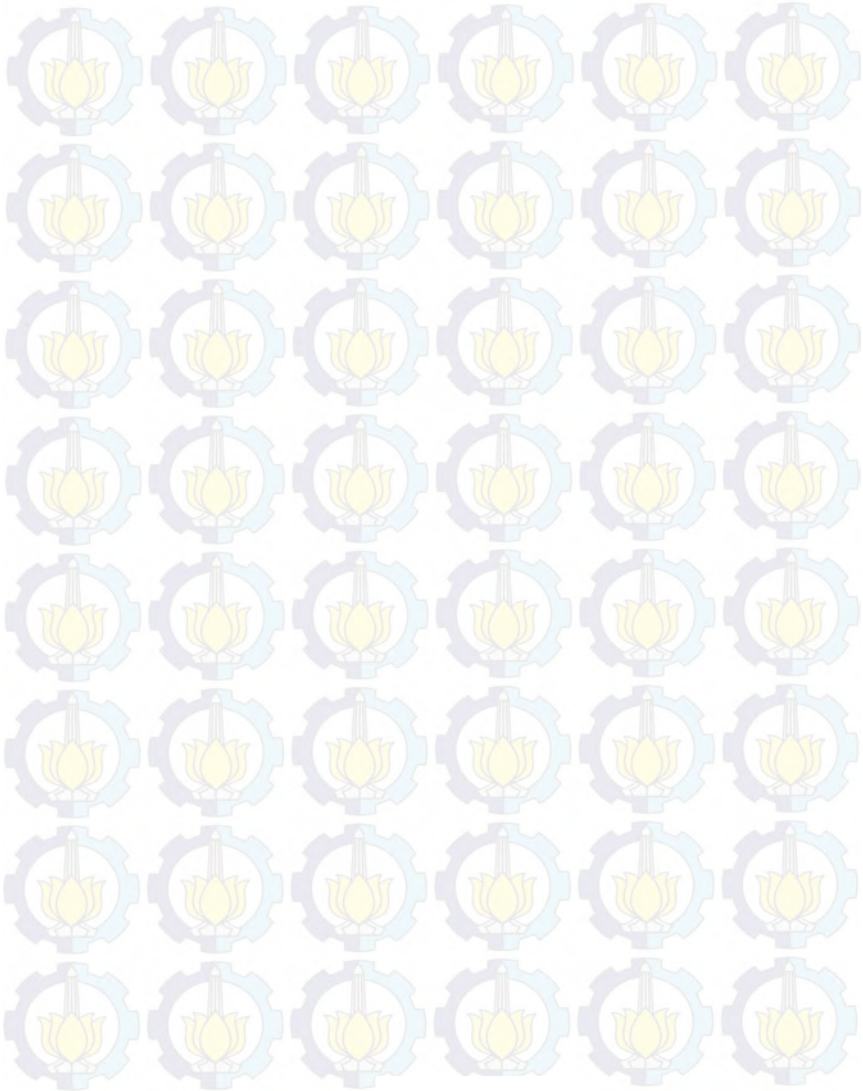
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Sabut Kelapa (<i>Coconut Husk</i>).....	8
Gambar 2.2	Pemanfaatan Bahan Lignoselulosa	9
Gambar 2.3	Struktur Molekul Hemiselulosa	10
Gambar 2.4	Struktur Selulosa.....	11
Gambar 2.5	Skema Proses Pretreatment.....	12
Gambar 2.6	Degradasi Selulosa oleh Sistem Enzim Selulase.....	14
Gambar 2.7	Struktur Kitin dan <i>Chitosan</i>	15
Gambar 2.8	Penghilangan Gugus Asetil pada Gugus Asetamida.....	17
Gambar 2.9	Imobilisasi enzim dengan teknik carrier-binding	19
Gambar 2.10	Imobilisasi secara Adsorpsi fisik	20
Gambar 2.11	Metode Imobilisasi Pengikatan Kovalen	21
Gambar 2.12	Metode Imobilisasi Pengikatan Silang	21
Gambar 2.13	Metode Imobilisasi Penjebakan dan Mikrokapsul.....	22
Gambar 2.14	Proses Hidrolisi Selulosa	27
Gambar 2.15	Gambar Struktur Molekul Coomassie Brilliant Blue	29
Gambar 3.1	Rangkaian Alat Pretreatment NaOH 1%.....	33
Gambar 3.2	Pemurnian dengan Ammonium Sulfat.....	38
Gambar 3.3	Proses Pembuatan Kurva Standar Glukosa.....	40
Gambar 3.4	Rangkaian Alat Hidrolisis Sabut Kelapa.....	45
Gambar 3.5	Diagram Alir Tahapan Keseluruhan Penelitian	47
Gambar 3.6	Diagram Alir Tahap <i>Pretreatment</i> Bahan Baku.....	48
Gambar 3.7	Diagram Alir Tahap Produksi <i>Crude Enzyme</i>	49

Gambar 3.8	Diagram Alir Tahap Pemurnian dengan Amonium Sulfat	50
Gambar 3.9	Diagram Alir Tahap Imobilisasi Enzim dengan Chitosan	51
Gambar 3.10	Diagram Alir Tahap Persiapan Material Chitosan-GDA.....	52
Gambar 3.11	Diagram Alir Tahap Imobilisasi Enzim Chitosan-GDA	53
Gambar 3.12	Diagram Alir Tahap Hidrolisis Selulosa dan Hemiselulosa	54
Gambar 3.13	Diagram Alir Tahap Uji Konsentrasi Gula Reduksi	55
Gambar 4.1	Kurva Standar Glukosa (dengan CMC).....	64
Gambar 4.2	Kurva Standar Protein Untuk Menguji Kadar Protein dalam Enzim Selulase	68
Gambar 4.3	Kurva Proses Pengendapan dengan <i>Ammonium Sulfate</i>	70
Gambar 4.4	Mekanisme Reaksi Antara <i>Chitosan</i> dan Selulase.....	73
Gambar 4.5	Prosedur Imobilisasi dengan Membran Chitosan.....	74
Gambar 4.6	Mekanisme Reaksi antara Chitosan dengan GDA dan Chitosan-GDA dengan Selulase	79
Gambar 4.7	Prosedur Imobilisasi dengan Membran Chitosan-GDA.....	81
Gambar 4.8	Kurva Standar Glukosa (tanpa CMC).....	86
Gambar 4.9	Metodologi Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim Crude	88
Gambar 4.10	Metodologi Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim Hasil Pemurnian.....	89
Gambar 4.11	Metodologi Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim Hasil Imobilisasi dengan Chitosan	90
Gambar 4.12	Metodologi Hidrolisis	

	Sabut Kelapa dengan Enzim Hasil Imobilisasi dengan Chitosan-GDA	91
Gambar 4.13	Kurva Konsentrasi Gula Reduksi Tiap Variabel Crude Enzim pada Hidrolisis I	92
Gambar 4.14	Kurva Perbandingan Konsentrasi Total Gula Reduksi Tiap Variabel Crude Enzim pada Hidrolisis Pertama	93
Gambar 4.15	Proses Pemisahan Secara Magnet dari Enzim Chitosan Terimobilisasi dengan Produk Hasil Hidrolisis	95
Gambar 4.16	Kurva Konsentrasi Gula Reduksi Tiap Variabel Crude Enzim Terimobilisasi pada Hidrolisis Kedua untuk <i>Reusability</i>	96
Gambar 4.17	Kurva Perbandingan Konsentrasi Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Pertama dan Kedua untuk <i>Reusability</i>	97
Gambar 4.18	Kurva Konsentrasi Gula Reduksi Tiap Variabel Enzim Murni pada Hidrolisis dengan Enzim Murni.....	100
Gambar 4.19	Kurva Perbandingan Konsentrasi Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzim Crude dan Enzim Murni Terimobilisasi Chitosan dan Chitosan-GDA	102
Gambar 4.20	Kurva Perbandingan konsentrasi Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzim Crude, Enzim Purifikasi, dan Enzim Murni.....	103

(Halaman ini sengaja dikosongkan)



DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Komposisi Media Fermentasi untuk Produksi Enzim	36
Tabel 4.1	Komposisi Sabut Kelapa Tanpa <i>Pretreatment</i> Kimiawi	58
Tabel 4.2	Presentase Hemiselulosa, Selulosa, Lignin Pretreatment.....	60
Tabel 4.3	Perhitungan Kurva Standar Glukosa dengan CMC	63
Tabel 4.4	Aktivitas Crude Enzim Selulase dari <i>A. Niger</i>	65
Tabel 4.5	Aktivitas Crude Enzim Selulase dari <i>A. Niger</i> Purifikasi.....	65
Tabel 4.6	Aktivitas Crude Enzim Selulase dari Enzim Murni	66
Tabel 4.7	Data Total Protein Enzim Selulase Setelah Uji Bradford.....	68
Tabel 4.8	Perbandingan Garam Pengendapan Protein Purifikasi.....	71
Tabel 4.9	Hasil Pemurnian <i>Crude</i> Enzim Selulase.....	72
Tabel 4.10	Hasil Uji Aktivitas Enzim <i>Crude</i> Selulase Imobilisasi Chitosan.....	74
Tabel 4.11	Hasil Uji Kadar Protein Enzim <i>Crude</i> Imobilisasi Chitosan.....	75
Tabel 4.12	Hasil Uji Aktivitas Enzim Murni Selulase Imobilisasi Chitosan.....	77
Tabel 4.13	Hasil Uji Kadar Protein Enzim <i>Murni</i> Imobilisasi Chitosan.....	78
Tabel 4.14	Hasil Uji Protein <i>Crude</i> Imobilisasi Chitosan-GDA	81
Tabel 4.15	Hasil Uji Aktivitas Enzim <i>Crude</i> Imobilisasi Chitosan-GDA	82
Tabel 4.16	Hasil Uji Kadar Protein Enzim Murni Imobilisasi Chitosan-GDA	83

Tabel 4.17	Hasil Uji Aktivitas Enzim Murni Imobilisasi Chitosan-GDA	84
Tabel 4.18	Perhitungan Kurva Standar Glukosa untuk Hidrolisis tanpa CMC.....	85
Tabel 4.19	Perhitungan <i>Specific Activity</i> pada Hidrolisis Pertama	97
Tabel 4.20	Perhitungan <i>Specific Activity</i> pada Hidrolisis Kedua	98
Tabel 4.21	Perbandingan Hasil Protein Aktivitas, Rateined Activity	99
Tabel 4.22	Hasil Perhitungan Yield Gula per Massa Selulosa+Hemiselulosa	104

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Bahan bakar fosil dan gas alam merupakan sumber energi utama di dunia ini. Pembakaran bahan bakar fosil dapat menyebabkan pemanasan global yang disebabkan oleh emisi gas rumah kaca terutama CO₂. Bahan bakar fosil merupakan sumber energi yang tidak dapat diperbarui. Ketergantungan penduduk di dunia terhadap bahan bakar fosil merupakan suatu masalah yang serius. Pertumbuhan penduduk di dunia yang semakin lama semakin meningkat mengakibatkan kebutuhan energi juga meningkat. Peningkatan kebutuhan akan energi ini akan mengakibatkan semakin meningkatnya penggunaan bahan bakar fosil sebagai sumber energi utama sehingga menyebabkan semakin menipisnya persediaan bahan bakar fosil dan akan habis dalam jangka waktu tertentu.

Telah dilakukan perhitungan dengan model Klass, dan didapatkan bahwa waktu habisnya sumber minyak, batubara dan gas masing-masing adalah 35, 107 dan 37 tahun (Shafiee dkk., 2009). Dari data tersebut dapat diketahui sumber energi yang semakin lama semakin menipis dan akan habis, sehingga dapat mendorong masyarakat dunia khususnya dibidang penelitian untuk mencari energi alternatif (*biofuel*) yang salah satunya dengan cara memanfaatkan limbah pertanian atau industri guna mengurangi pencemaran lingkungan.

Indonesia merupakan negara agraris dan beriklim tropis penghasil beragam jenis tumbuhan dan perkebunan seperti padi, jagung, tebu, dan kelapa. Produksi buah kelapa di Indonesia sangat melimpah yakni rata-rata 2,9 juta ton/tahun (Kementrian Pertanian Indonesia, 2014). Salah satu limbah dari kelapa yang memiliki potensi besar untuk diolah adalah sabut kelapa. Kandungan dari sabut kelapa terdiri dari 22% selulosa (S), 10% hemiselulosa (H), 47% lignin, 12% air (*moisture*), 1,5% abu dan 7,5% ekstrak (Bilba, dkk., 2007). Kandungan selulosa dan hemiselulosa dari sabut

kelapa yang tinggi dapat dihidrolisis menjadi monomer gula yang selanjutnya dapat digunakan untuk produksi gula reduksi. Proses hidrolisis ini biasanya dilakukan dengan proses hidrolisis enzimatik, karena hidrolisis enzimatik mempunyai yield yang lebih besar bila dibanding hidrolisis berkatalis asam (Chen, dkk., 2008).

Lignoselulosa tersusun dari lignin dan karbohidrat seperti selulosa dan hemiselulosa dan komponen lainnya seperti protein, garam dan mineral. Lignin yang menyebabkan bahan- bahan lignoselulosa sulit untuk dihidrolisis. Selulosa secara alami diikat oleh hemiselulosa dan tersusun secara padat oleh lapisan lignin (Kotarska, dkk., 2014). Oleh sebab itu, proses *pretreatment* dan hidrolisis merupakan tahapan sangat penting yang dapat mempengaruhi perolehan *yield* (Iranmahboob dkk., 2002) dan (Singh, 2014). Dengan metode *pretreatment* dapat meningkatkan aktivitas hidrolisis enzimatik, baik dengan cara mengkondisikan bahan-bahan lignoselulosa dari segi struktur dan ukuran dengan merusak struktur lignin, memecah dan menghilangkan kandungan lignin dan hemiselulosa yang menyebabkan peningkatan porositas bahan, mengurangi kristal dari selulosa, serta menurunkan derajat polimerisasi selulosa (Sun dan Cheng, 2002) dan (Ahmed, dkk., 2013). Dengan merusak struktur dari selulosa akan mempermudah terurainya selulosa menjadi glukosa, dan hemiselulosa akan terurai menjadi senyawa gula sederhana, seperti glukosa, galaktosa, manosa, heksosa, pentosa, xilosa, dan arabinosa (Mosier dkk., 2005).

Hidrolisis enzimatik merupakan salah satu metode yang paling umum yang digunakan untuk mengkonversikan biomasa yang dapat diperbaharui menjadi gula sederhana. Akan tetapi, dengan harga enzim yang pada umumnya mahal, apabila tidak dapat digunakan kembali, harga produksinya akan sangat mahal dan sebanding dengan aplikasi pada industri berskala besar. Strategi untuk penggunaan kembali enzim dapat dilakukan dengan imobilisasi enzim. (Cheng dan Chang, 2013)

Setelah diketahui bahwa penggunaan kembali enzim sangat terbatas, banyak perhatian yang diberikan kepada imobilisasi

enzim dimana imobilisasi enzim itu sendiri menawarkan banyak manfaat, sebagai contoh adanya kemungkinan untuk digunakan pada proses yang kontinyu, pemberhentian reaksi secara cepat, mengontrol pembentukan produk, memudahkan untuk memisahkan enzim dari suatu campuran dan mampu beradaptasi terhadap berbagai macam desain kimia (Cao dkk., 2013)

Sebagai material pendukung dari imobilisasi enzim, membran yang digunakan adalah membran polimer karena membran ini memiliki berbagai macam fungsi dan dapat dimodifikasi secara kimia. Salah satu material polimer pendukung yang paling sering digunakan adalah agarose dan chitosan. Chitosan adalah biopolimer kation yang tersusun atas (1,4)-linked-2-amino-deoxy- β -D-glucan yang merupakan penurunan deasetaldehyd dari kitin dan merupakan polisakarida yang tersedia dalam jumlah banyak di alam. Chitosan merupakan material pendukung yang murah, inert, *hydrophilic*, dan sesuai untuk proses biologis dan merupakan material pendukung yang tepat untuk imobilisasi enzim. Kehadiran dari gugus amino memfasilitasi adanya ikatan kovalen dari enzim (Ghaffar, 2013).

Bermula dari ketersediaan bahan bakar fosil yang semakin lama semakin menipis dan akan habis, serta untuk mencari sumber energi alternatif (*biofuel*) yang ketersediaanya melimpah dan ramah lingkungan, maka dilakukan suatu penelitian dengan upaya menghasilkan gula reduksi yang merupakan salah satu bahan utama dari pembuatan *biofuel* dimana dihasilkan dari salah satu bahan limbah pertanian yaitu sabut kelapa, yang memiliki kandungan lignoselulosa berlignin tinggi dan dilakukan hidrolisis enzimatik dengan menggunakan enzim selulase terimobilisasi dengan metode ikatan kovalen dan *cross linking* dengan material pendukung chitosan dan chitosan-GDA(1%).

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang diatas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Penggunaan bahan bakar *fossil* yang tidak dapat diperbaharui meningkat seiring dengan pertumbuhan penduduk sehingga dilakukan studi untuk memungkinkan adanya energi alternatif yang dapat diperbaharui dan ramah lingkungan pengganti bahan bakar *fossil* dari limbah pertanian.
2. Bahan lignoselulosa, yang terdapat pada tumbuhan dan limbah pertanian tersedia sangat melimpah di Indonesia terutama kelapa. Kelapa dapat memberikan limbah sabut kelapa yang sangat besar dan belum optimal pemanfaatannya padahal mengandung selulosa dan hemiselulosa yang tinggi.
3. Selulosa dan hemiselulosa pada bahan sabut kelapa dapat di hidrolisis menggunakan metode hidrolisis enzimatik akan tetapi harga dari enzim yang pada umumnya mahal merupakan kendala sehingga perlu dilakukan imobilisasi enzim untuk mendapatkan hidrolisis enzimatik yang ekonomis.

I.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bahan baku yang digunakan berupa sabut kelapa.
2. *Pretreatment* yang dilakukan adalah *pretreatment* basa dengan NaOH (1%).
3. Hidrolisis yang dilakukan dengan menggunakan enzim selulase *crude* tanpa imobilisasi, enzim selulase *crude* dengan pemurnian menggunakan ammonium sulfat, dan enzim selulase terimobilisasi.
4. Imobilisasi enzim selulase yang dilakukan menggunakan dua metode yakni ikatan kovalen dengan chitosan sebagai material pendukung dan *cross linking* dengan chitosan-GDA (1%).

I.4 Tujuan Penelitian

1. Memanfaatkan bahan sabut kelapa yang sangat melimpah dengan melakukan konversi sabut kelapa menjadi gula reduksi dengan metode hidrolisis enzimatik.

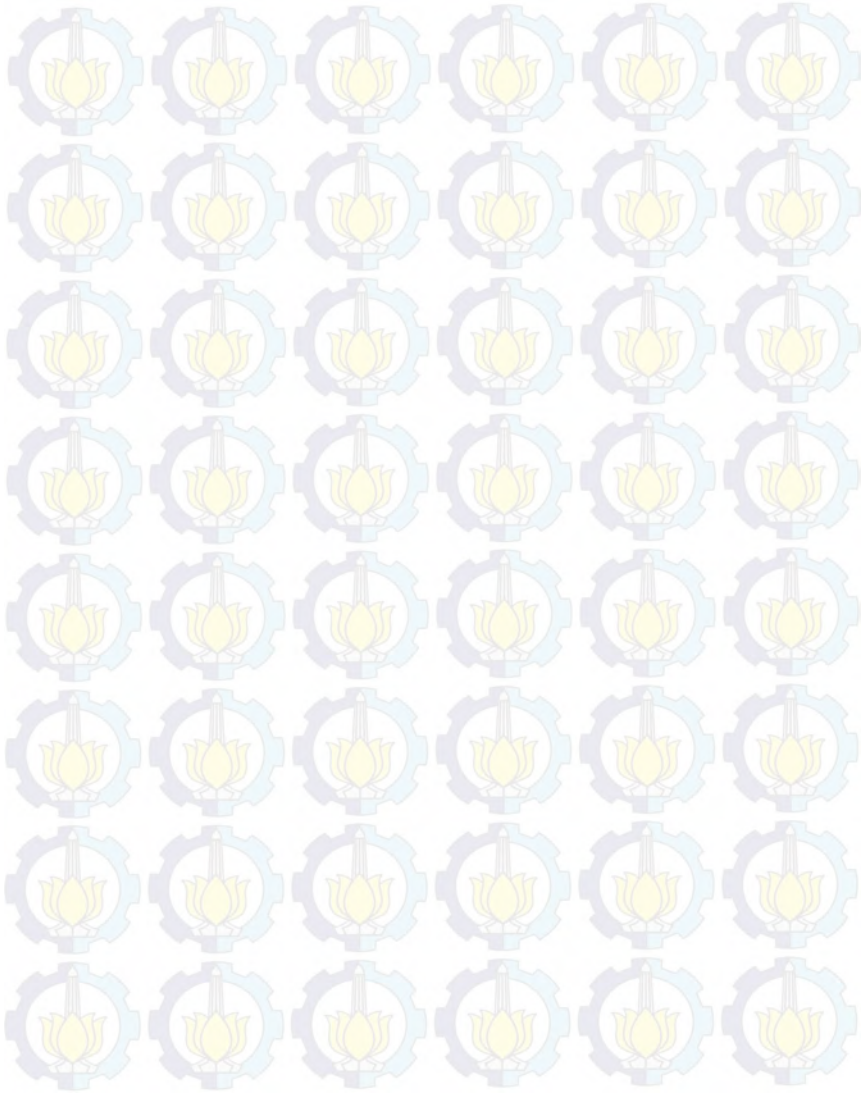
2. Mendegradasi serat selulosa dalam sabut kelapa secara dengan *pretreatment* basa dan metode hidrolisis enzimatik menggunakan *crude* enzim terimobilisasi.
3. Membandingkan hasil analisa gula reduksi antara hidrolisis enzimatik menggunakan *crude* enzim tanpa imobilisasi dan tanpa pemurnian, *crude* enzim tanpa imobilisasi dan dengan pemurnian, *crude* enzim terimobilisasi dengan chitosan, dan *crude* enzim terimobilisasi dengan chitosan-GDA(1%).

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui kegunaan lain dari sabut kelapa yang selama ini hanya dianggap sebagai limbah pertanian.
2. Mendapatkan hak cipta dan paten atas penelitian tentang pembuatan gula reduksi dengan hidrolisis sabut kelapa hasil *pretreatment* menggunakan *crude* enzim terimobilisasi.
3. Sebagai salah satu cara untuk membuat bahan baku pembuatan sumber energi terbarukan yaitu *biofuel* yang ramah lingkungan.
4. Secara tidak langsung turut berperan dalam penghematan penggunaan bahan bakar *fossil*.

(Halaman ini sengaja dikosongkan)



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Sabut Kelapa (*Coconut Husk*)

Kelapa (*Cocos nucifera*) merupakan salah satu anggota tanaman palma yang paling dikenal dan banyak tersebar di daerah tropis. Pohon kelapa merupakan jenis tanaman berumah satu dengan batang tanaman tumbuh lurus ke atas dan tidak bercabang. Tinggi pohon kelapa biasanya dapat mencapai 30 meter. (Paskawati, dkk., 2010).

Buah kelapa (*Cocos nucifera*) selain sebagai sumber karbohidrat juga sebagai sumber lemak, protein, kalori, vitamin dan mineral. Nutrisi karbohidrat yang terkandung dalam daging kelapa sebesar 10-14 g/100g berat basah. Buah kelapa juga mengandung serat kasar 58%. Analisis ampas kelapa kering mengandung 13% selulosa dapat berperan dalam proses fisiologi tubuh (Meddiati, 2010).

Sabut kelapa tersusun atas unsur organik dan mineral yaitu : Pectin dan hemisellulose (merupakan komponen yang larut dalam air), Lignin dan sellulose (komponen yang tidak larut dalam air), kalium, kalsium, magnesium, nitrogen serta protein. Perbandingan komponen organik dan mineral yang ada tergantung dari umur sabut kelapanya. Serat sabut memiliki daya apung yang tinggi, tahan terhadap bakteri, air garam dan murah, sedang kelemahannya ialah, tidak dapat di gintir dengan baik dan tergolong serat kaku. Mutu serat sabut kelapa atau *coconut fibre*, ditentukan oleh warna, prosentase kotoran, kadar air dan proporsi antara bobot serat panjang dan serat yang pendek (Sudarsono, 2010)

Salah satu pemanfaatan sabut kelapa sebagai bahan baku produksi glukosa melalui proses hidrolisis, karena mengandung bahan lignoselulosa. Sabut kelapa merupakan salah satu biomassa yang mudah didapatkan dan merupakan hasil samping pertanian. Komposisi sabut kelapa dalam buah kelapa sekitar 35% dari berat keseluruhan buah kelapa. Produk primer dari pengolahan sabut kelapa terdiri atas serat (serat panjang), *bristle* (serat halus dan

pendek) dan debu sabut (Mahmud dan Ferry, 2005). Kandungan dari sabut kelapa terdiri dari 22 % selulosa (S), 10% hemiselulosa (H), 47% lignin, 12% air (*moisture*), 1,5% abu dan 7,5% ekstrak (Bilba, dkk., 2007).

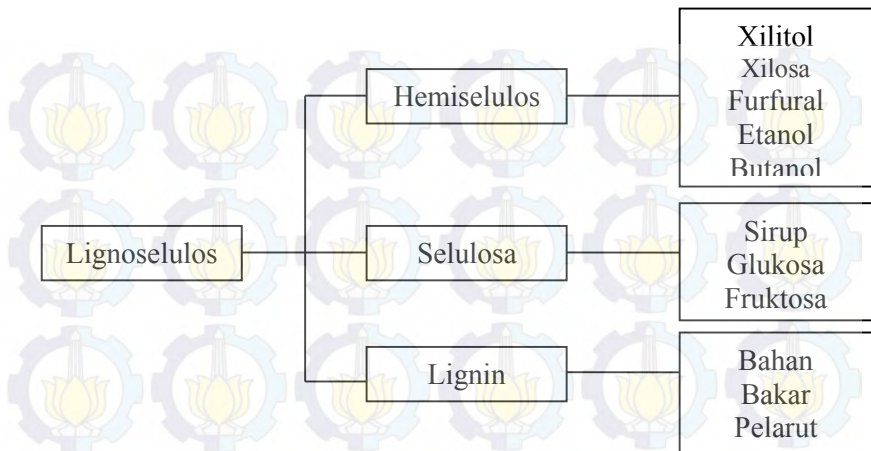


Gambar 2.1 Sabut Kelapa (*Coconut Husk*)

II.2 Lignoselulosa

Lignoselulosa sebagai salah satu sumber polisakarida yang melimpah, dapat dikonversi menjadi etanol sebagai suatu alternatif sumber energi hijau. Indonesia sebagai negara tropis memiliki sumber-sumber lignoselulosa sangat melimpah. Oleh karena itu, pengembangan proses pembuatan etanol dari lignoselulosa tentu memberi manfaat untuk kemajuan masyarakat. Senyawa lignoselulosa terdiri atas tiga komponen utama, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin yang merupakan bahan utama penyusun dinding sel tumbuhan. Ketiga komponen utama tersebut membentuk suatu ikatan kimia yang kompleks menjadi bahan dasar dinding sel tumbuhan. (Setyaningsih dan Dody, 2013)

Bahan lignoselulosa merupakan komponen organik yang berlimpah di alam, yang tersusun dari tiga polimer yaitu selulosa (35-50%), hemiselulosa (20-35%), dan lignin (10-25%). Komponen ini merupakan sumber utama untuk menghasilkan produk bernilai tinggi seperti gula dari hasil fermentasi, bahan kimia, bahan bakar cair, sumber karbon dan energi (Saha dkk., 2005).

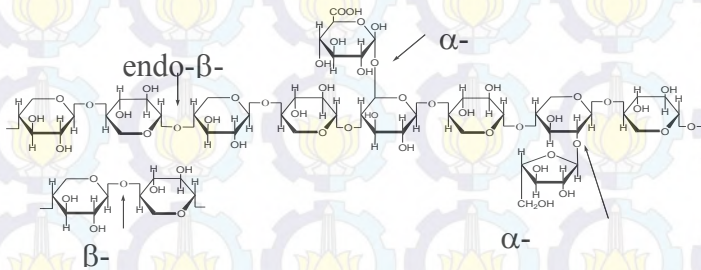


Gambar 2.2 Pemanfaatan Bahan Lignoselulosa (Humprey, 1997)

Hemiselulosa atau yang disebut juga poliosa, merupakan polimer lain yang terkandung dalam bahan lignoselulosa. Hemiselulosa terdiri atas berbagai macam gula monomer yakni, monomer pentosa (seperti xylosa dan arabinosa) dan heksosa (seperti glukosa, manosa dan galaktosa), dengan struktur *amorf* (Bailey dan Ollis, 1986). Hemiselulosa memiliki rantai polimer yang pendek dan tidak berbentuk, sehingga sebagian besar dapat larut dalam air. Oleh karena itu, hemiselulosa relatif mudah dihidrolisis oleh asam menjadi monomer-monomernya (Girio dkk., 2010).

Hemiselulosa berfungsi mendukung dalam dinding-dinding sel dan sebagai perekat. Dengan derajat polimerisasi hanya 200, maka hemiselulosa akan terdegradasi lebih dahulu daripada selulosa (Widjaja, 2009). Komponen utama hemiselulosa kayu lunak adalah glukomanan sedangkan komponen utama hemiselulosa kayu keras adalah xilan, xilan terikat pada selulosa, pektin, lignin dan polisakarida lainnya untuk membentuk dinding sel tanaman. Jumlah xilan di alam sangat besar dimana merupakan jumlah terbesar kedua setelah selulosa (Subramariyan dan Prema,

2002). Menurut Ladish (1989) dan Cao *et al.* (1995), hemiselulosa jika dihidrolisis sempurna secara asam akan menjadi D-xilosa 50-70 % b/b dan L-arabinosa 5-15 % b/b.

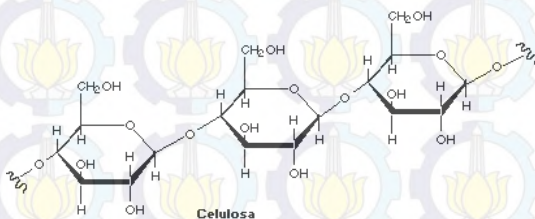


Gambar 2.3 Struktur Molekul Hemiselulosa

Selulosa adalah bagian lain dari lignoselulosa dan merupakan salah satu polimer yang tersedia melimpah di alam. Produksi selulosa sekitar 100 milyar ton setiap tahunnya. Sebagian dihasilkan dalam bentuk selulosa murni seperti yang terdapat dalam rambut biji tanaman kapas. Namun paling banyak adalah yang berkombinasi dengan lignin dan polisakarida lain seperti hemiselulosa dalam dinding sel tumbuhan berkayu, baik pada kayu lunak dan keras, jerami atau bambu. Selain itu selulosa juga dihasilkan oleh bakteri *Acetobacter xylinum* secara ekstraseluler. Senyawa ini juga dijumpai dalam plankton bersel satu atau alga di lautan, juga pada jamur dan bakteri. Sebagai bahan baku kimia, selulosa telah digunakan dalam bentuk serat atau turunannya selama sekitar 150 tahun (Kurniawan, 2010).

Selulosa adalah polimer glukosa yang berbentuk rantai linier dan dihubungkan oleh ikatan β -1,4 glikosidik. Struktur yang linier menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis. Di alam, biasanya selulosa berasosiasi dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tumbuhan. Setiap unit anhidroglukopiranososa memiliki tiga gugus hidroksil. Selulosa

mempunyai rumus empirik $(C_6H_{10}O_5)_n$ dengan $n \sim 1500$ dan berat molekul ~ 243.000 (Holtzapfle, 1991).



Gambar 2.4 Struktur Selulosa

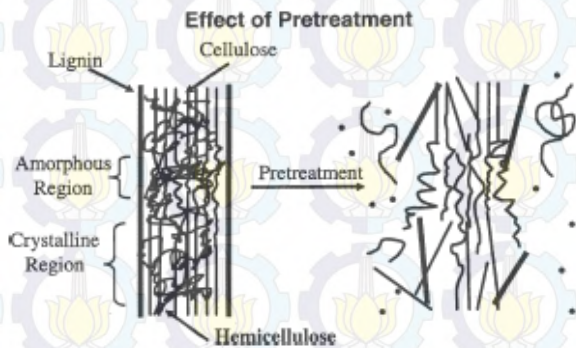
Selulosa merupakan polimer yang relatif stabil dikarenakan adanya ikatan hidrogen. Selulosa tidak larut dalam pelarut air dan tidak memiliki titik leleh. Serat selulosa juga memiliki fleksibilitas dan elastisitas yang baik sehingga dapat mempertahankan aspect ratio (perbandingan panjang terhadap diameter (P/d)) yang tinggi selama proses produksi. Selulosa nanoserat memiliki beberapa keuntungan seperti: densitas rendah, sumber yang dapat diperbaharui, biodegradable, mengurangi emisi karbondioksida di alam, kekuatan dan modulus yang tinggi, permukaan yang relatif reaktif sehingga dapat digunakan untuk grafting beberapa gugus kimia, dan harga yang murah.

Bagian lain dari lignoselulosa adalah lignin. Struktur molekul lignin berbeda bila dibandingkan polisakarida karena terdiri atas sistem aromatik yang terusun atas unit-unit fenilpropana yaitu koniferil, sinapil, dan p-kumaril (Howard dkk, 2003). Lignin berfungsi untuk melindungi hemiselulosa dan selulosa dari aksi kimiawi, serta dapat membentuk ikatan kovalen dengan beberapa komponen hemiselulosa, oleh karena itu lignin sangat sulit untuk didegradasi oleh mikroba ataupun bahan kimia lainnya, dibandingkan dengan selulosa atau hemiselulosa. Dengan menggunakan metode hidrolisis lignin pada kondisi suhu yang rendah ($\pm 1000C$) dapat terurai menjadi *methoxy phenols*. Selain itu lignin dapat dioksidasi oleh larutan alkali dan mudah larut dalam larutan sulfit dalam keadaan biasa (Octavia,2011).

Dibandingkan dengan selulosa atau hemiselulosa, pemecahan lignin terjadi sangat lambat oleh jamur dan bakteri. Lignin dapat dioksidasi oleh larutan alkali dan bahan oksidator lain serta tahan terhadap proses hidrolisis oleh asam-asam mineral tetapi mudah larut dalam larutan sulfit dalam keadaan biasa (Schlegel dan Hans, 1994).

II.3 Pretreatment Alkali

Pretreatment menggunakan alkali adalah proses pretreatment yang paling umum digunakan dengan menggunakan NaOH dan $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Proses ini menghasilkan penghapusan semua lignin dan bagian dari hemiselulosa, dan peningkatan reactivity dari selulosa. Penghilangan lignin efektif meminimalkan adsorpsi dari enzim ke lignin dan dengan demikian dapat membebaskan selulosa. Pretreatment dengan menggunakan NaOH meningkatkan kadar selulosa yang didapat hingga 55% sementara penurunan lignin antara 20 sampai 25 %.



Gambar 2.5. Skema proses pretreatment

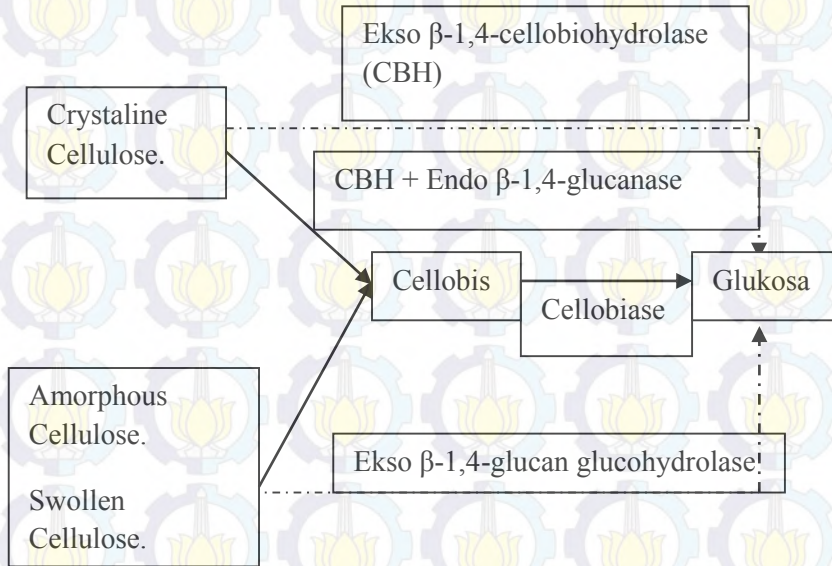
II.4 Enzim Selulase

Selulase merupakan kumpulan dari beberapa enzim yang bekerja secara bersama/sinergis untuk hidrolisis selulosa. Pada

umumnya selulase mendegradasi selulosa yang memiliki rantai yang lebih pendek dari komponen kayu (selulosa, hemiselulosa, lignin, ekstraktif dan mineral). Rantai selulosa yang lebih pendek tersebut dapat ditemukan pada hemiselulosa (glukosa, galaktosa, manosa, xylosa, arabinosa). Karena komponen hemiselulosa yang memiliki sifat seperti selulosa adalah glukosa maka dari itu hemiselulosa terlebih dahulu terdegradasi dibandingkan dengan selulosa. Mikroorganisme tertentu menghasilkan partikel yang dinamakan selulosom. Enzim yang dapat menghirolisis ikatan $\beta(1-4)$ pada selulosa adalah selulase. Hidrolisis enzimatis yang sempurna memerlukan aksi sinergis dari tiga tipe enzim ini, yaitu :

1. Endo-1,4- β -D-glucanase adalah *glycoprotein* dengan berat molekul 5300-145000. Endo-1,4- β -D-glucanase (endoselulase/CMCase) mengurai polimer selulosa secara random pada ikatan internal α -1,4-glikosida untuk menghasilkan oligodekstrin dengan panjang rantai yang bervariasi (Ikram dkk, 2005). Enzim ini menyerang rantai bagian dalam dari selulosa amorphous yang menghasilkan selodextrin, sellobiosa, atau glukosa. Enzim ini tidak dapat menghidrolisa selulosa kristal secara sendirian, namun pada saat yang bersamaan dengan Exo- β -1,4-glucanase enzim ini dapat mendegradasi selulosa kristal secara intensif
2. Exo-1,4- β -D-glucanase atau yang biasa disebut cellobiohidrolase merupakan *glycoprotein* dengan berat molekul 42000-65000. Terdapat dua jenis Exo- β -1,4-glucanase yaitu Exo- β -1,4-cellobiohidrolase dan Exo- β -1,4-glucan glukohidrolase. Exo-1,4- β -D-glucanase mengurai selulosa dari ujung pereduksi dan non pereduksi untuk menghasilkan selobiosa dan/atau glukosa. Kerja dari enzim ini dihambat dengan adanya produk yaitu selobiosa atau glukosa. (Ikram dkk, 2005).
3. β -glucosidase (cellobiase) adalah *glycoprotein* dengan berat molekul 50000-410000. Enzim ini juga dapat menghidrolisa selobiosa menjadi glukosa dan juga dapat

mendegradasi seloligosakarida dan kerja enzim ini juga di hambat oleh produk reaksi yaitu glukosa. (Ikram dkk, 2005).



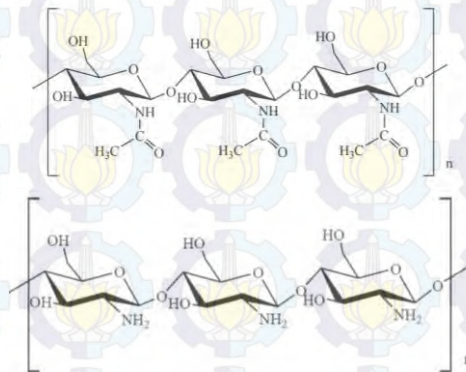
Gambar 2.6 Degradasi selulosa oleh sistem enzim selulase

Selulase adalah campuran beberapa enzim yang komposisinya bervariasi, dan tergantung kepada mikroorganisme yang digunakan untuk memproduksi serta prosesnya. Endoglukanase (endo- β -1,4-D-glukan-4-glukanohidrolase) bertugas memecah ikatan β -1,4-glukanohidrolase pada rantai selulosa secara acak, eksoglukanase (β -1,4-D-glukanselobiohidrolase) yang bertugas memecah satuan selobiosa dari ujung rantai dan β -glukosidase yang bertugas memecah selobiosa menjadi glukosa (Dahot dan Noomrio, 1996).

II.5 Chitosan

Chitosan adalah turunan kitin yang hanya dibedakan oleh gugus radikal CH_3 dan CO pada struktur polimernya. Kitin

merupakan poli-N-asetil-glukosamin, sedangkan *chitosan* adalah kitin yang terdeasetilasi sebanyak mungkin tapi tidak cukup sempurna untuk dinamakan sebagai poli glukosamin. Kitin ini umumnya diperoleh dari kerangka hewan invertebrata dari kelompok Arthropoda sp, Molusca sp, Coelenterata sp, Annelida sp, Nematoda sp, dan beberapa dari kelompok jamur. Selain dari kerangka hewan invertebrate, juga banyak ditemukan pada bagian insang ikan, trachea, dinding usus dan pada kulit cumi-cumi. Sebagai sumber utamanya ialah hasil deasetilasi cangkang Crustaceae sp, yaitu udang, lobster, kepiting, dan hewan yang bercangkang lainnya, terutama asal laut (Mozzarelli, 1999)



Gambar 2.7 Struktur Kitin dan *Chitosan*

Proses deasetilasi kitin dilakukan menggunakan larutan NaOH pekat, yang bertujuan untuk mengubah gugus asetil dari kitin menjadi gugus amina pada *Chitosan*. Perubahan ini dapat dideteksi dengan membandingkan spektra FTIR hasil deasetilasi kitin dengan kitin sebelum dilakukan deasetilasi pada panjang gelombang tertentu yang karakteristik. *Chitosan* tergolong polisakarida rantai monomer lurus. *Chitosan* tersusun dari glukosamin yang terhubung melalui ikatan (1-4) β glikosidik (Jia, 2015). *Chitosan* merupakan padatan amorf putih yang tidak larut dalam alkali dan asam mineral kecuali pada keadaan tertentu. *Chitosan* merupakan molekul polimer yang mempunyai berat

molekul tinggi. *Chitosan* dengan berat molekul tinggi dan mempunyai viskositas yang baik dalam suasana asam. *Chitosan* hasil deasetilasi kitin larut dalam asam encer seperti asam asetat dan asam formiat (Kumar, 2000).

Chitosan merupakan produk biologis yang bersifat kationik, nontoksik, biodegradable dan biokompatibel. *Chitosan* memiliki gugus amino (NH_2) yang relatif lebih banyak dibandingkan kitin sehingga lebih nukleofilik dan bersifat basa. Kristalinitas *Chitosan* yang disebabkan oleh ikatan hidrogen intermolekuler maupun intramolekuler lebih rendah dibandingkan kitin sehingga lebih mudah diaplikasikan dalam beberapa reagen. Pelarut yang baik untuk *Chitosan* adalah asam format, asam asetat dan asam glutamat. *Chitosan* tidak larut dalam air dan beberapa pelarut organik seperti dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), pelarut alkohol organik dan piridin. *Chitosan* larut dalam asam organik/mineral encer melalui protonasi gugus amino bebas (NH_2NH_3^+) pada pH kurang dari 6,5. Kelarutan *Chitosan* menurun dengan bertambahnya berat molekul *chitosan*. Parameter lain yang berpengaruh pada sifat *chitosan* adalah berat molekul (BM) dan derajat deasetilasi (DD). Derajat deasetilasi menunjukkan berkurangnya gugus asetil dari kitin menjadi gugus amino pada *chitosan*.

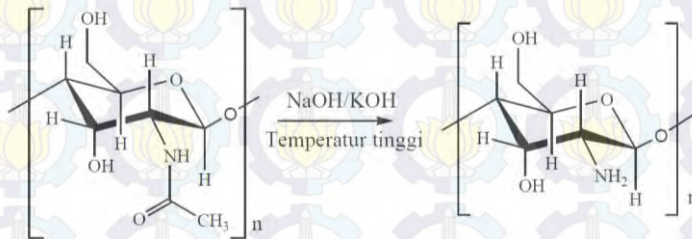
Chitosan memiliki sifat unik yang dapat digunakan dalam berbagai cara serta memiliki kegunaan yang beragam, antara lain sebagai perekat, bahan aditif pada kertas dan tekstil, penjernihan air minum, dan untuk mempercepat penyembuhan luka, serta memperbaiki sifat pengikatan warna. *Chitosan* merupakan pengkelat yang kuat untuk ion logam transisi. *Chitosan* mempunyai kemampuan untuk mengadsorpsi logam dan membentuk kompleks *chitosan* dengan logam (Roberts, 1992).

Chitosan juga bersifat hidrofilik, sehingga mampu menahan air dalam strukturnya dan membentuk gel secara spontan. Pembentukan gel berlangsung pada pH asam atau sedikit basa yang disebabkan adanya sifat kationik *chitosan*. Gel *chitosan*

selanjutnya dapat terdegradasi secara berangsur-angsur, sebagaimana halnya chitosan melarut (Muzzarelli *et al.*, 1988).

Chitosan mempunyai sifat antimikrobia melawan jamur lebih kuat dari kitin. Jika *chitosan* ditambahkan pada tanah, maka akan menstimulir pertumbuhan mikrobia mikrobia yang dapat mengurai jamur. Selain itu *chitosan* juga dapat disempatkan langsung pada tanaman. Sifat kitin dan *chitosan* dapat mengikat air dan lemak. Karena sifatnya yang dapat bereaksi dengan asam-asam seperti polifenol, maka *chitosan* sangat cocok untuk menurunkan kadar asam pada buah-buahan, sayuran dan ekstrak kopi. *Chitosan* mempunyai sifat polikationik, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agen penggumpal.

Proses penghilangan gugus asetil dinamakan deasetilasi. Proses deasetilasi bertujuan untuk memutuskan ikatan kovalen antara gugus asetil dengan nitrogen pada gugus asetamida kitin sehingga berubah menjadi gugus amina ($-\text{NH}_2$). Dengan demikian pelepasan gugus asetil pada asetamida kitin menghasilkan gugus amina terdeasetilasi. Mekanisme penghilangan gugus asetil pada gugus asetmida oleh suatu basa ditunjukkan pada Gambar dibawah



Gambar 2.8 Penghilangan Gugus Asetil pada Gugus Asetamida

Ukuran besarnya penghilangan gugus asetil pada gugus asetamida kitin dikenal dengan istilah derajat deasetililasi (DD). Jika DD 40-100% disebut *chitosan* (Terbojevich, 2000), sedangkan Khan *et al.* (2002) menyatakan bahwa kitin dengan DD 75% atau lebih

umumnya dikenal sebagai *chitosan*. Derajat deasetilasi adalah salah satu karakteristik kimia yang paling penting karena DD mempengaruhi *performance chitosan* (Khan *et al.*, 2002)

II.6 Imobilisasi

Imobilisasi enzim adalah enzim yang secara fisik dibatasi gerakannya atau ditempatkan pada suhu ruang untuk mempertahankan katalitiknya dan dapat digunakan secara berulang-ulang (Chibata, 1978). Enzim imobilisasi adalah enzim yang terikat atau tertutup oleh medium yang tidak terlarut atau molekul enzim yang telah disilangkan dengan yang lain tanpa kehilangan aktivitas katalitiknya (Palmer, 1991).

Teknik imobilisasi enzim adalah teknik yang digunakan agar enzim tidak bergerak, baik melalui pengikatan pada padatan pendukung maupun penjebakan pada matriks. Tujuan imobilisasi enzim adalah untuk meningkatkan aktivitas enzim dan menggunakan enzim imobilisasi tersebut untuk fermentasi ulang secara batch maupun fermentasi kontinyu (Panji, 1998). Sedangkan menurut Muchtadi dkk (1992), enzim terimobilisasi adalah enzim yang diikatkan ke dalam bahan yang sifatnya inert sehingga pergerakannya dalam ruang telah dibatasi seluruhnya atau hanya pada daerah tertentu saja. Tujuan utamanya adalah untuk menciptakan daya katalitik enzim yang berkesinambungan. Dalam imobilisasi enzim, pengikatan enzim pada suatu karier harus terjadi tanpa adanya kerusakan pada struktur ruang tiga dimensi dari sisi aktif enzim tersebut, sehingga spesifitas substrat maupun gugus fungsi aktif tidak terganggu oleh proses ini. Aktivitas dan stabilitas enzim dipengaruhi oleh metoda imobilisasi, jenis enzim maupun jenis matrik yang digunakan.

Imobilisasi enzim memiliki keuntungan didalam penggunaannya. Keuntungan penggunaan enzim yang telah diimobilisasi ini diantaranya adalah:

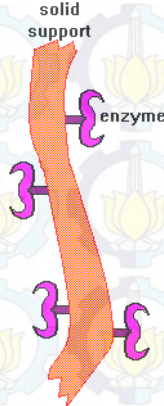
1. Sistem enzim yang telah diimobil dapat digunakan berulang-ulang

2. Memungkinkan proses pengoperasian secara berkesinambungan
3. Dapat meminimalkan terjadinya pencampuran antara hasil reaksi dengan residu
4. Memudahkan pengendalian kondisi reaksi
5. Dapat menyebabkan penurunan aktivitas katalitik enzim untuk beberapa kasus.

Metode imobilisasi enzim ada tiga jenis, yaitu carrier-binding, pengikatan silang (cross linking), dan penjebakan.

1. Carrier-binding

Metode carrier-binding merupakan metode tertua dalam imobilisasi enzim. Dengan metode ini, enzim akan dikat ke dalam suatu pembawa yang bersifat tidak dapat larut di dalam air. Pada metode ini, jumlah enzim yang terikat pada pembawa dan aktivitas enzim setelah diimobilisasi bergantung pada sifat pembawanya. Pemilihan jenis pembawa akan bergantung pada karakteristik enzim seperti: ukuran partikel, luas permukaan, perbandingan gugus hidrofob dengan hidrofil, dan komposisi kimia enzim



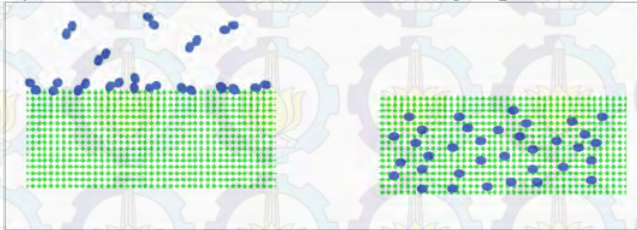
Gambar 2.9 Imobilisasi enzim dengan teknik carrier-binding

Pada umumnya, perbandingan gugus hidrofil dan konsentrasi dari enzim terikat yang tinggi akan menghasilkan aktivitas enzim terimobilisasi yang lebih tinggi. Beberapa jenis pembawa yang digunakan adalah turunan polisakarida seperti,

selulosa, dekstran, agarosa, dan gel poliakrilamid. Metode carrier-binding dibagi menjadi tiga jenis, yaitu adsorpsi fisik, pengikatan secara ionik, dan pengikatan secara kovalen.

a. Adsorpsi fisik

Metode imobilisasi enzim dengan teknik adsorpsi fisik didasarkan pada fenomena adsorpsi enzim pada permukaan pembawa yang tidak dapat larut di dalam air. Kelebihan imobilisasi enzim dengan cara ini adalah enzim tidak mengalami perubahan konformasi dan metode ini sederhana dan murah. Kekurangan imobilisasi enzim dengan teknik ini adalah enzim dapat mengalami desorpsi sebagai akibat perubahan temperatur dan pH. Lepasnya enzim yang telah terikat pada pembawa dapat terjadi karena lemahnya kekuatan ikatan antara enzim dengan pembawa.



Gambar 2.10 Imobilisasi secara Adsorpsi fisik

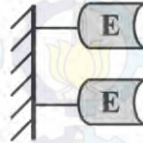
b. Pengikatan secara ionik

Prinsip imobilisasi enzim dengan teknik ini adalah enzim akan terikat secara ionik pada pembawa yang mengandung residu penukar ion. Polisakarida dan polimer sintesis memiliki pusat penukar ion yang dapat digunakan sebagai pembawa. Pengikatan ionik antara enzim dengan pembawa mudah dilakukan jika dibandingkan dengan pengikatan enzim secara kovalen. Imobilisasi enzim dengan pengikatan ionik dapat mengakibatkan terjadinya sedikit perubahan konformasi dan sisi aktif enzim

c. Pengikatan secara kovalen

Metode imobilisasi enzim dengan teknik ini didasarkan pada pengikatan enzim pada pembawa melalui ikatan kovalen. Gugus fungsi yang sering terlibat dalam proses imobilisasi enzim dengan teknik ini adalah gugus amino, gugus hidroksil, gugus

karboksil, dan gugus fenolik. Kondisi yang harus dicapai untuk proses imobilisasi enzim dengan teknik ini lebih rumit jika dibandingkan dengan teknik pengikatan secara ionik dan adsorpsi fisik. Imobilisasi enzim dengan pengikatan secara kovalen dapat menyebabkan perubahan pada konformasi enzim sehingga dapat terjadi penurunan aktivitas enzim yang cukup besar



Gambar 2.11 Metode Imobilisasi Pengikatan Kovalen

2. Pengikatan Silang (cross linking)

Imobilisasi enzim dengan teknik ini didasarkan pada pengikatsilangan antara enzim dengan pembawa. Pengikatsilangan enzim ini biasanya dilakukan oleh pereaksi bifungsi atau multifungsil. Dengan teknik ini, enzim akan terikat cukup kuat pada pembawa, sehingga kemungkinan untuk terjadi desorpsi enzim sangat kecil. Walaupun demikian, teknik ini dapat menyebabkan terjadi perubahan sisi aktif enzim secara bermakna dan aktivitas enzim setelah diimobilisasi menjadi sangat rendah. Pereaksi yang paling banyak digunakan untuk pengikatsilangan enzim dengan pembawa adalah glutaraldehid.

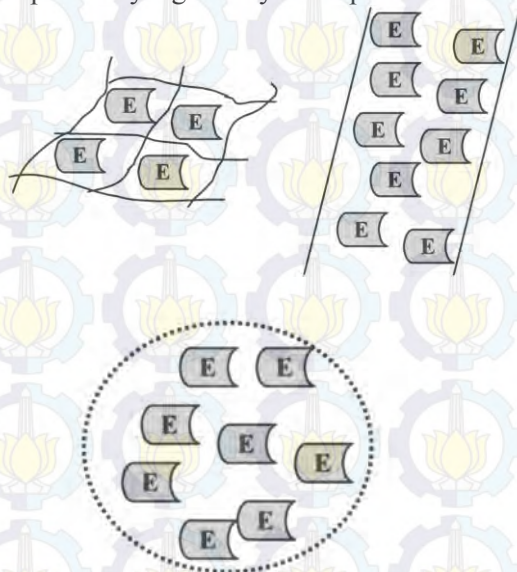


Gambar 2.12 Metode Imobilisasi Pengikatan Silang

3. Penjebakan Enzim

Imobilisasi enzim dengan teknik penjebakan didasarkan pada penempatan enzim di dalam kisi-kisi matriks polimer atau

membran. Teknik ini berbeda dengan teknik imobilisasi dengan pengikatan secara kovalen maupun secara pengikatan silang, karena enzim tidak terikat pada kisi-kisi membran atau polimer. Terdapat dua jenis penjebakan enzim, yaitu penjebakan ke dalam kisi dan penjebakan ke dalam kapsul berukuran mikro. Penjebakan ke dalam kisi biasanya menggunakan polimer baik polimer alami ataupun polimer sintetis. Beberapa polimer sintetis yang sering digunakan adalah poliakrilamid dan polivinil alkohol, sedangkan polimer alami yang sering digunakan adalah pati. Penjebakan ke dalam kapsul berukuran mikro melibatkan pemasukan enzim ke dalam membran polimer yang sifatnya semipermeable



Gambar 2.13 Metode Imobilisasi Penjebakan dan Mikrokapsul

Sifat dari enzim imobil berbeda dengan enzim yang terdapat bebas dalam larutan dan tergantung dari metode imobilisasi dan carier alami yang tidak terlarut. Penurunan pada aktivitas spesifik muncul saat enzim sebagian proses kimia dilibatkan saat kondisi mungkin menyebabkan denaturasi.

Bagaimanapun carier membentuk lingkungan mikro baru bagi enzim dan hal tersebut dapat mempengaruhi aktivitas dalam langkah yang berbeda. Sebagai contoh, karakteristik enzim dapat berubah jika sisi aktif mengalami perubahan konformasi sebagai hasil interaksi antara enzim dan carier. Carier dapat mempengaruhi karakteristik enzim dengan membentuk rintangan sterik dengan pencegahan difusi bebas dari substrat ke semua molekul enzim atau dengan membentuk interaksi elektrostatis dengan molekul substrat atau produk (Palmer, 1991). Sedangkan menurut Goel (1994), enzim yang diimobilkan akan mengalami perubahan komposisi yang dimungkinkan akibat dari sisi aktif enzim yang berikatan dengan matriks sehingga mengakibatkan berkurangnya katalitik enzim tersebut. Menurut Fardiaz (1998), aktivitas enzim imobil dapat dibedakan atas dua macam yaitu :

1. Aktivitas relative (V_1) yaitu perbandingan aktivitas enzim imobil dengan aktivitas enzim bebas dalam jumlah yang sama.
2. Aktivitas spesifik absolut (V_2) yaitu kecepatan reaksi per unit berat atau unit volume dari seluruh katalis. Aktivitas relatif menunjukkan tingkat deaktivasi enzim yang disebabkan oleh proses imobilisasi, sedangkan aktivitas absolut dapat menunjukkan kemungkinan untuk mengimobilisasi lebih banyak atau lebih sedikit enzim per unit volume katalis.

Enzim yang diimobilisasi dapat kehilangan aktivitasnya karena beberapa hal yaitu (Fardiaz, 1988) :

1. Beberapa enzim mungkin diimobilisasi pada matriks dengan konfigurasi sedemikian rupa sehingga menghambat kontak antara substrat dengan sisi aktif enzim.
2. Gugus reaktif pada sisi aktif enzim mungkin ikut terikat pada matriks. Perlindungan sisi aktif oleh inhibitor reversible selama pengikatan akan mempertahankan aktivitasnya

3. Molekul enzim selama pengikatan mungkin berubah menjadi konfigurasi inaktif.
4. Kondisi reaksi selama pengikatan mungkin menyebabkan denaturasi atau inaktivasi enzim.

Stabilitas enzim pada pemanasan atau penyimpanan dapat meningkat, menurun atau tetap sama saat diimobilisasi tergantung bagaimana lingkungan mikro baru mempengaruhi kecenderungan perubahan sifat (Palmer, 1991). Disamping itu Goel (1994) menyatakan bahwa stabilitas enzim terimobil tergantung dari lingkungan mikro yang dapat menyebabkan protein dasar dari enzim terdenaturasi atau tetap stabil. Lingkungan mikro dapat didefinisikan sebagai lingkungan yang mempengaruhi dari pertumbuhan dan perkembangan mikroba atau untuk enzim yang diproduksi mikroba.

Secara internal, aktivitas enzim dapat ditingkatkan dengan melihat bagaimana susunan/komposisi enzim tersebut, dimana enzim tersusun atas asam-asam amino. Untuk meningkatkan aktivitas enzim, susunan asam-asam amino tersebut dapat dirubah. Selain itu, juga dapat dilihat bagaimana sisi aktif enzim, jika masih ada yang tertutup diupayakan agar terbuka sehingga tidak menghambat pengikatan enzim dengan substrat.

Secara eksternal, peningkatan aktivitas enzim dapat dilakukan mulai pada tahap persiapan/preparasi sebelum enzim tersebut dihasilkan. Misalnya, memberi media yang baik untuk pertumbuhan mikrobia penghasil enzim agar mikrobia tersebut dapat menghasilkan enzim dengan optimal, manajemen fermentasi sehingga proses pemanenan bisa dilakukan pada saat yang tepat, dan bisa pula dilakukan dengan penambahan ion logam karena ada sebagian enzim yang dapat bekerja lebih baik apabila ada ion logam tertentu.

Faktor-faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah konsentrasi enzim, substrat, produk, senyawa (inhibitor dan aktivator), pH dan suhu lingkungan. Sifat-sifat enzim dapat dipelajari dengan mengetahui pengaruh faktor-faktor tersebut

terhadap enzim, sekaligus mengetahui lingkungan yang dapat memaksimumkan maupun menghambat aktivitas enzim (Muchtadi dkk., 1992).

Suhu dapat mempengaruhi proses biologi melalui efek kinetika pada laju reaksi dan efek katalitik pada aktivitas atau kestabilan enzim (Smith, 1993). Laju reaksi akan terus meningkat seiring dengan meningkatkannya suhu. Enzim merupakan protein yang akan mengalami proses inaktivasi enzim dengan semakin tinggi suhu (Muchtadi dkk., 1992), bahkan pada suhu terlalu tinggi akan terjadi denaturasi enzim (Fardiaz, 1988). Struktur aktif enzim pada kondisi normal dijaga oleh keseimbangan kekuatan non kovalen yang berlainan, yaitu ikatan hidrogen, hidrofobik, ionik, dan van Der Waals. Kenaikan suhu akan menurunkan kekuatan ikatan tersebut sehingga molekul protein enzim akan terbuka. Pusat aktif enzim selalu terdiri dari beberapa residu asam amino yang terdapat pada struktur tiga dimensi protein enzim, maka pembukaan inti molekul protein menyebabkan kerusakan pusat aktif sehingga enzim menjadi inaktif (Fardiaz, 1988).

Semua enzim dipengaruhi oleh pH medium tempat reaksi terjadi, setiap percobaan dengan enzim diperlukan buffer untuk mengontrol pH reaksi (Suhartono, 1989). Enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitas maksimal. Kondisi pH enzim pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang paling penting pada sisi katalitik enzim berada pada titik ionisasi yang diinginkan, maka akan menunjukkan aktivitas enzim yang sama dengan pH lingkungan normalnya, dengan pH yang mungkin sedikit berada di atas atau di bawah pH optimum (Lehninger, 1995). Selain itu enzim yang diimobilkan memiliki stabilitas panas yang lebih baik jika dibandingkan dengan enzim yang tidak diimobilkan. pH optimum dapat berubah sampai 2 unit pH saat enzim diimobilisasi, sebagian besar dipengaruhi oleh lingkungan mikro yang baru (Palmer, 1991).

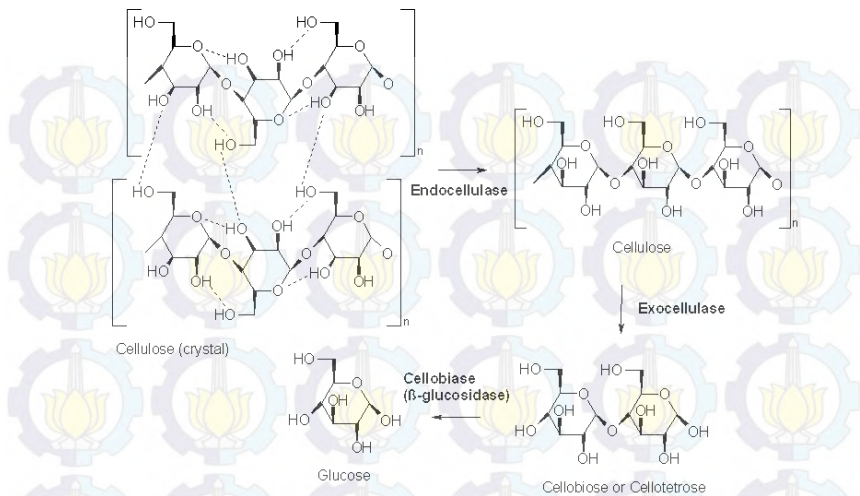
II.7 Hidrolisis Enzimatik

Hidrolisis enzimatik selulosa melibatkan enzim selulase yang bekerja sangat spesifik (Sun dan Cheng, 2002). Hidrolisis enzimatik selulosa merupakan sistem reaksi yang kompleks yang mencakup beberapa tahap yaitu: perpindahan massa selulase dari bulk cairan ke permukaan partikel selulosa, adsorpsi selulase membentuk senyawa kompleks enzim-substrat, hidrolisis selulosa, perpindahan selodekstrin dari permukaan partikel substrat ke bulk cairan dan hidrolisis selodekstrin dan selobiosa menjadi glukosa dalam fasa cair. Adsorpsi selulase oleh substrat merupakan tahap kritis yang terutama dipengaruhi oleh struktur selulosa dan karakteristik enzim (Walker and Wilson, 1991).

Mekanisme hidrolisis enzimatik selulosa menjadi glukosa adalah rumit, karena enzim selulase paling sedikit terdiri dari endoglukanase (EG), selobiohidrolase (CBH) dan β -glukosidase (β G), serta substratnya mengandung bagian kristalin dan bagian amorf, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1. Li dkk. (2004) mengusulkan penyederhaan reaksi hidrolisis selulosa menjadi dua tahap seperti berikut:



Tahap pertama adalah reaksi heterogen antara substrat yang tidak larut (S) dengan enzim terlarut menghasilkan oligosakharida (O) yang larut oleh aksi sinergi CBH dan EG yang dianggap sebagai tahap pengendali hidrolisis keseluruhan. Tahap kedua adalah reaksi homogen pemecahan oligosakharida menjadi produk akhir glukosa (G) yang dikatalisis oleh β G dan mencapai kesetimbangan karena lebih cepat dari reaksi tahap pertama.



Gambar 2.14 Proses Hidrolisi Selulosa

Enzim yang digunakan untuk membelah hubungan glikosidik di glikosida hidrolisis selulosa termasuk endo-acting selulase dan glucosidases exo-acting. Enzim tersebut biasanya dikeluarkan sebagai bagian dari kompleks multienzim yang mungkin termasuk dockerins dan selulosa modul mengikat. Ketiga jenis reaksi yang dikatalisis oleh enzim selulase: 1. Kerusakan dari interaksi non-kovalen hadir dalam struktur kristal selulosa (endo-selulase) 2. Hidrolisis serat selulosa individu untuk memecah menjadi gula yang lebih kecil (ekso-selulase). 3. Hidrolisis disakarida dan tetrasakarida menjadi glukosa (beta-glukosidase)

II.8 Pemurnian Enzim

Salah satu cara yang dapat digunakan untuk pemekatan enzim adalah melalui pengendapan. Pengendapan enzim selulase dilakukan dengan penambahan ammonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) hingga konsentrasi 80% jenuh. Pengendapan ini bertujuan untuk pemurnian enzim sehingga dapat meningkatkan aktivitas spesifik enzim tersebut. Pengendapan enzim terjadi berdasarkan tingkat kelarutan protein dalam cairan yang dipengaruhi kekuatan ionik

dalam cairan (konsentrasi garam). Penambahan garam dengan konsentrasi tinggi dapat menurunkan kelarutan protein, hal ini disebabkan air yang semula terikat pada permukaan protein berikatan dengan garam. Interaksi antar protein akan meningkat dan interaksi antar protein-air menurun sehingga protein teragregasi dan mengendap (Triana, 2013).

Asam-asam amino, peptida-peptida kecil dan molekul kecil lainnya akan tetap tinggal dalam larutan. Bergantung kadar garam, sebagian protein mengendap, dan ada yang tertinggal dilarutan. Kelipatan pemekatan enzim selulase ditentukan dengan menghitung peningkatan aktivitas enzim selulase antara ekstrak kasar enzim dan enzim pekat hasil pengendapan. Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan mengukur konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan dari aktivitas enzim selulase menggunakan metode Nelson-Somogyi. Uji aktivitas enzim selulase menggunakan dua substrat CMC dan avisel. CMC merupakan substrat yang berbentuk amorf menunjukkan adanya aktivitas enzim endoglukanase, sedangkan avisel merupakan substrat yang berbentuk.

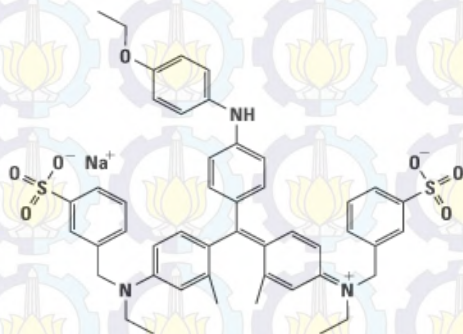
Fraksinasi dengan garam berdasarkan pada sifat-sifat garam seperti kelarutan dan keefektifannya dalam mengendapkan protein. Garam-garam yang sangat efektif adalah garam-garam yang mengandung anion yang bermuatan banyak seperti sulfat, fosfat dan sitrat. Garam yang paling sering digunakan adalah garam amonium sulfat. Amonium sulfat yang terlarut setelah proses fraksinasi dipisahkan dengan cara dialisis. Prinsip dialisis adalah difusi garam amonium sulfat melalui membran semipermeabel.

Penggunaan amonium sulfat untuk salting out memiliki keuntungan antara lain harga relative murah, kelarutannya tinggi, pH larutan tidak berubah secara ekstrem, dan tidak bersifat toksik. Kerugiannya ialah konsentrasi garam yang tertinggal dalam produk tinggi dan kurang efisien dalam menghilangkan pencemar. Pengendapan protein dengan pelarut organik seperti aseton akan menghasilkan produk dengan aktivitas tinggi, tetapi kondisi reaksi harus dipertahankan pada suhu rendah (-5°C) untuk mencegah

denaturasi protein. Proses pemurnian menyebabkan hilangnya kofaktor yang penting sehingga menyebabkan hilangnya aktivitas enzim. Selain itu dapat pula terjadi denaturasi protein akibat pengaruh suhu dan pH selama pemurnian berlangsung.

II.9 Uji Bradford

Uji Bradford adalah suatu uji untuk mengukur konsentrasi protein total dengan secara kolorimetri dalam suatu larutan. Dalam uji Bradford melibatkan pewarna Coomassie Brilliant Blue (CBB) yang berikatan dengan protein dalam suatu larutan yang bersifat asam sehingga memberikan warna (kebiruan). Karena menghasilkan warna, sehingga secara kolorimetri dapat diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometri (Lambert-Beer) pada panjang gelombang 465-595 nm (cahaya tampak).



Gambar 2.15 Gambar Struktur Molekul Coomassie Brilliant Blue

Kompleks warna biru pada larutan yang diberi reagen Bradford sangat cepat terbentuk dan bersifat stabil. Kestabilan warna biru Coomassie Brilliant Blue G-250 ini karena adanya interaksi antara lapisan hidrofobik dari protein dengan bentuk anion dari zat warna Coomassie Brilliant Blue G-250 yang menstabilkan bentuk anion tersebut (Bradford 1976).

Ikatan yang terjadi antara zat warna Coomassie Blue G-250 dan protein dapat terjadi dikarenakan adanya gaya van der Waals antara keduanya. Gaya van der Waals dapat terjadi karena

adanya bagian protein yang bersifat hidrofobik mengikat bagian dari zat warna Coomassie Blue G-250 (penyusun reagen Bradford) yang bersifat non polar sehingga mengakibatkan zat warna tersebut melepaskan elektronnya ke bagian hidrofobik protein. Selain itu, antara zat warna dan protein juga terdapat kekuatan ionik yang memperkuat ikatan antara keduanya dan membuat zat warna tersebut menjadi stabil. Hal ini lah yang digunakan pada metode Bradford untuk menentukan kadar protein di dalam suatu larutan. Kandungan protein yang berikatan dengan zat warna tersebut dapat diukur dengan menggunakan instrument spectronic 20 D untuk mengukur nilai absorbansnya pada panjang gelombang kisaran 465-595 nm. Selanjutnya, nilai absorbans tersebut dapat digunakan untuk membuat kurva standar yang menjadi dasar penentuan konsentrasi dan kadar protein di dalam larutan. (Bradford 1976). Keuntungan dari metode ini adalah pereaksi yang digunakan sangat sederhana dan mudah disiapkan, nilai akurasi dan presisi data yang didapatkan cukup tinggi serta untuk menjamin keakuratan data sampel yang berada di luar jangkauan dapat dilakukan uji ulang yang hanya membutuhkan beberapa menit saja. Hal itu membuat keefektifan kerja sangat cepat (Bradford 1976).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Biokimia, Teknik Kimia Fakultas Teknik Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya pada bulan Agustus 2015 – Desember 2015

III.2 Variabel Penelitian

1. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis-jenis enzim yang digunakan untuk proses hidrolisis:
2. Enzim selulase tanpa imobilisasi dan tanpa purifikasi
3. Enzim selulase tanpa imobilisasi dengan purifikasi
4. Enzim selulase hasil imobilisasi dengan material pendukung chitosan.
5. Enzim selulase hasil imobilisasi dengan material pendukung chitosan *cross linked* dengan 1% glutaricdialdehyde (Chitosan-GDA)

III.3 Bahan dan Alat

III.3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Sabut Kelapa, *Potato Dextrose Agar* (Merck, Germany), Asam dinitrosalisilat (Sigma-Aldrich, Germany), CMC (*carboxymetil cellulose*) (Sigma-Aldrich, Germany), *Yeast ekstrak* (Merck), Glukosa (Merck), H_2SO_4 (Merck), strain jamur *Aspergillus niger* (Biochemical Laboratory, ITS Surabaya), Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, Germany) Serum Bovine Albumin (Biochemical Laboratory, ITS Surabaya), Coomassie Brilliant Blue (Merck), Aquadest, Natrium Sitrat (Merck), NaOH (Merck), Asam Sitrat (Merck), CH_3COOH (Merck), CH_3COONa (Merck), Chitosan flake (PT.KIMINDO, Surabaya), Glutaricdialdehyde (Merck), dan garam mineral untuk fermentasi (KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$,

MnSO₄·H₂O, dan FeSO₄·7H₂O) (Biochemical Laboratory, ITS Surabaya)

III.3.2 Alat Penelitian

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah *Autoclave* (Astell Scientific, Inggris), *Hot plate & stirrer* (Snijders), *Spectrophotometer* (Cecil CE 1011, Inggris), *Analitical balance* (Ohaus, Cina), *Incubator* (Incucell carbolit, Jerman), Kondensor refluks, Tabung reaksi, Kawat ose, Gelas ukur (Pyrex Iwaki, Indonesia), Corong kaca, Pipet volumetric (Pyrex Iwaki, Indonesia), Pipet ukur (Pyrex Iwaki, Indonesia), Pipet tetes, Gelas Beker (Pyrex Iwaki, Indonesia), Labu Ukur (Pyrex Iwaki, Indonesia), Erlenmeyer (Pyrex Iwaki, Indonesia), Oven (VWR Scientific S/P 1350 G-2, Amerika), *Vortex* (VM-300, Taiwan), Karet penghisap, Spatula, *Vacuum pump* (Weich), Rak kayu, Kuvet, Kertas Saring Whattman dan Screen untuk menyaring.

III.4 Tahapan Metode Penelitian

III.4.1 Pretreatment Sabut Kelapa

III.4.1.1 Pretreatment Mekanik (Douglas, 1988)

Sabut kelapa sebagai bahan baku yang diperoleh dari limbah hasil pertanian di kota Manado, dikeringkan dibawah sinar matahari selama 3 hari. Kemudian sampel tersebut digiling dengan menggunakan mesin penggiling. Selanjutnya sampel yang sudah berupa butiran-butiran dimasukkan kedalam oven selama 24 jam pada suhu 60°C dan diayak dengan menggunakan *screener* berukuran 100-120 mesh.

III.4.1.2 Pretreatment Kimia (NaOH 1% w/v)

Sebanyak 50 gram sabut kelapa yang telah mengalami perlakuan *pretreatment* mekanik, dimasukkan ke dalam labu alas bulat, kemudian ke dalam labu tersebut dimasukkan pula NaOH 1% sebanyak 10 ml. Campuran diaduk dengan pengaduk stirer dan dipanaskan pada suhu 80°C selama 16 jam. Setelah 16 jam, campuran didinginkan dan disaring, padatan dicuci dengan

aquades steril sampai pH 7. Selanjutnya, padatan yang sudah netral (pH 7) dioven pada suhu 60°C selama 24 jam. Kemudian, padatan didinginkan dan digiling kembali kemudian disimpan. Padatan sabut kelapa ini dioven kembali pada suhu 60°C selama 24 jam sebelum digunakan pada proses selanjutnya. Gambar rangkaian alat saat proses pretreatment NaOH 1%, ditampilkan dalam gambar 3.1



Keterangan:

1. Hotplate Stirrer
2. *Oil bath*
3. Labu Leher 2
4. Termometer
5. Kondensor Reflux

Gambar 3.1 Rangkaian Alat Pretreatment NaOH 1%

III.4.2 Analisa Kadar Selulosa, Hemiselulosa dan Lignin

Sebanyak 1 gram sampel (berat a) yang akan dianalisa kadar selulosa, hemiselulosa dan ligninnya dimasukkan ke dalam labu alas bulat 250 ml, kemudian ditambahkan 150 ml H₂O ke dalam labu tersebut. Campuran direflux pada suhu 100 °C dengan penangas air selama 1 jam, kemudian hasilnya disaring dengan kertas saring, residu yang diperoleh dicuci dengan air panas sebanyak 300 ml untuk menghilangkan sisa-sisa ekstrak yang tidak ikut terbuang. Padatan yang diperoleh dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C sampai beratnya konstan. Berat padatan ini disebut (berat b).

Selanjutnya, padatan b dimasukkan kembali ke dalam labu alas bulat 250 ml kemudian ditambahkan 150 ml H₂SO₄ 1 N dan direflux dengan penangas air selama 1 jam pada suhu 100°C. Hasilnya disaring dan dicuci sampai pH netral dan residunya dikeringkan hingga beratnya konstan dengan oven pada suhu 60 °C. Berat padatan ini disebut (berat c).

Tahap selanjutnya, padatan c dimasukkan kembali kedalam labu alas bulat 250 ml kemudian ditambahkan 10 ml H₂SO₄ 72% dan dibiarkan pada suhu kamar selama 4 jam, kemudian ditambahkan 150 ml H₂SO₄ 1 N dan direflux dengan penangas air selama 1 jam pada suhu 100°C. Hasilnya disaring dan dicuci sampai pH netral dan residunya dikeringkan hingga beratnya konstan dengan oven pada suhu 60°C. Berat padatan ini disebut (berat d). Kemudian padatan d diabukan dan ditimbang beratnya, berat padatan ini disebut (berat e). Cara mengetahui kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin dengan metode ini adalah, dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Kadar Selulosa} = \left[\frac{c - d}{a} \right] \times 100\%$$

$$\text{Kadar Hemiselulosa} = \left[\frac{b - c}{a} \right] \times 100\%$$

$$\text{Kadar Lignin} = \left[\frac{d - e}{a} \right] \times 100\%$$

III.4.3 Produksi *Crude Enzyme* Selulase dari *Strain Jamur A. Niger*

III.4.3.1 Tahap Persiapan *Crude Enzyme* Selulase

1. Prosedur pembiakan jamur *A. Niger* pada media agar miring. PDA sebanyak 3,9 gr dilarutkan dalam 100 ml *aquadest* dengan cara diaduk sambil dipanaskan di atas *hotplate*. Lalu ditambahkan agar batang sebanyak 0,6 gram hingga larut dan larutan berwarna jernih. Kemudian dituangkan dalam tiap tabung reaksi sebanyak 5 ml. Setelah itu media beserta tabung reaksi disterilisasi *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 psia selama 15

menit lalu didinginkan pada posisi miring. Kemudian jamur *A. niger* dan diinkubasikan pada suhu 30°C selama 7 hari.

2. Prosedur pembuatan larutan buffer sitrat pH 5,5. Asam sitrat sebanyak 5,7024 gram dan Na-sitrat sebanyak 20,6682 gram dilarutkan dalam aquadest hingga 1.000 ml. Kemudian dicek pH larutannya dengan kertas pH.
3. Prosedur pembuatan larutan buffer sitrat pH 3. Asam sitrat sebanyak 15,87 gram dan Na-sitrat sebanyak 4,06 gram dilarutkan dalam aquadest hingga 1.000 ml. Kemudian dicek pH larutannya dengan menggunakan kertas pH.
4. Proses pembuatan larutan buffer sodium acetate pH 5,5. Asam asetat 0,1 N sebanyak 24 ml dicampurkan dengan sodium acetate 0,1 N sebanyak 176 ml. Kemudian dicek pH larutannya dengan menggunakan kertas pH.
5. Proses pembuatan enzim selulase murni. Sebanyak 1 gram enzim selulase murni dari *Aspergillus Niger* dilarutkan dengan 100 ml buffer sitrat pH 3. Kemudian hasilnya dianalisa dengan analisa DNS untuk mengetahui aktifitas enzim selulase murni
6. Prosedur pembuatan media fermentasi untuk produksi selulase.
 - a. Melakukan pembiakan strain jamur dalam media agar miring dengan media standard *Potato Dextrose Agar* (PDA) seperti dilaporkan Nakamura dan Sawada (1997).
 - b. Persiapan substrat untuk pertumbuhan. Substrat yang digunakan untuk produksi enzim selulase adalah jerami padi 100-120 mesh (Milala dkk., 2005)
 - c. Persiapan medium fermentasi. Digunakan medium fermentasi media padat (*solid state fermentation*) dengan perbandingan (jerami padi : media = 5 gram : 25 mL), larutan garam mineral dan yeast ekstrak sebagai sumber nitrogen organik

untuk meningkatkan produksi enzim selulase. Pada tabel 3.1 terlihat komposisi untuk media fermentasi produksi enzim.

Tabel 3.1 Komposisi Media Fermentasi untuk Produksi Enzim

Komponen	Komposisi (gr/L)
Yeast Ekstrak	5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,7
KH_2PO_4	1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,8
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,7

Mengatur pH medium pada pH 5,5 dengan menggunakan Buffer Sitrat pH 5,5. Medium fermentasi beserta substrat untuk pertumbuhan jamur dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 ml, kemudian disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya didinginkan pada suhu ruangan.

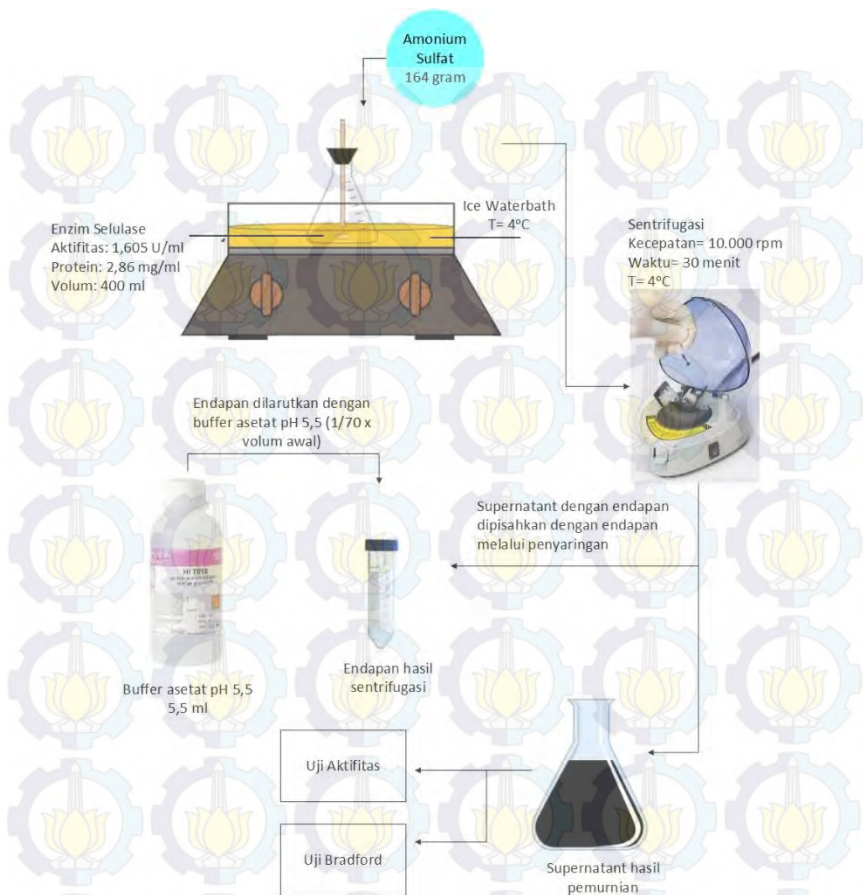
III.4.3.2 Tahap Produksi *Crude Enzyme* Selulase

Tahap Produksi *Crude Enzyme* dari *A.niger* dengan Substrat Jerami Padi. Jamur *A. niger* diinokulasikan sebanyak 2 cm² ke dalam labu erlenmeyer 250 ml yang berisi 5 gram substrat jerami padi dan larutan garam mineral yang telah disterilkan dalam *autoclave* untuk produksi *crude enzyme* selulase. Kemudian substrat jerami padi dan larutan garam mineral yang berisi suspensi

jamur diinkubasikan pada inkubator pada suhu 32°C selama 8 hari. Media fermentasi yang telah ditumbuhi jamur ditambahkan dengan 100 ml larutan buffer sitrat pH 3 yang mengandung 0,1 % Tween-80, kemudian dihomogenkan dengan orbital shaker pada 175 rpm selama 135 menit. Lalu disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit. Kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring halus untuk memisahkan filtrat dengan mycelia beserta endapan media di dalamnya dimana supernatan mengandung enzim yang diproduksi dalam penelitian ini.

III.4.3.3 Pemurnian dengan Pengendapan menggunakan Ammonium Sulfate

Ammonium sulfate padat ditambahkan pada 400 ml supernatan hasil ekstraksi enzim sampai 80% jenuh. Penambahan *ammonium sulfate* dilakukan secara perlahan pada suhu 4°C. Kemudian campuran didiamkan selama semalam pada suhu 4°C untuk mendapatkan endapan yang maksimal. Endapan yang terjadi kemudian dikumpulkan dengan sentrifugasi pada 10,000 rpm selama 30 menit dengan suhu 4°C. Endapan yang diperoleh dilarutkan lagi dengan 1/70 x volum buffer 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) yakni 5,5 ml . Metodologi pemurnian dengan pengendapan menggunakan *ammonium sulfate* ditunjukkan pada gambar 3.2 berikut:



Gambar 3.2 Metodologi Pemurnian dengan *Ammonium Sulfate*

III.4.4 Persiapan Uji Aktivitas Enzim

III.4.4.1 Pembuatan Larutan DNS (Asam Dinitrosalisilat) (Widjaja, 2009)

NaOH sebanyak 16 gram dilarutkan dengan akuades hingga volume 200 mL. Kemudian sodium potassium tartrate sebanyak 30 gram dan sodium metabisulfite sebanyak 8 gram dilarutkan dengan akuades sampai volume 500 mL. 10 gram DNS dilarutkan menggunakan larutan NaOH sebanyak 200 mL. Kemudian larutan DNS ditambahkan kedalam larutan sodium potassium tartrate dan sodium metabisulfite, setelah itu dilarutkan sempurna dengan akuades hingga volume 1000 mL.

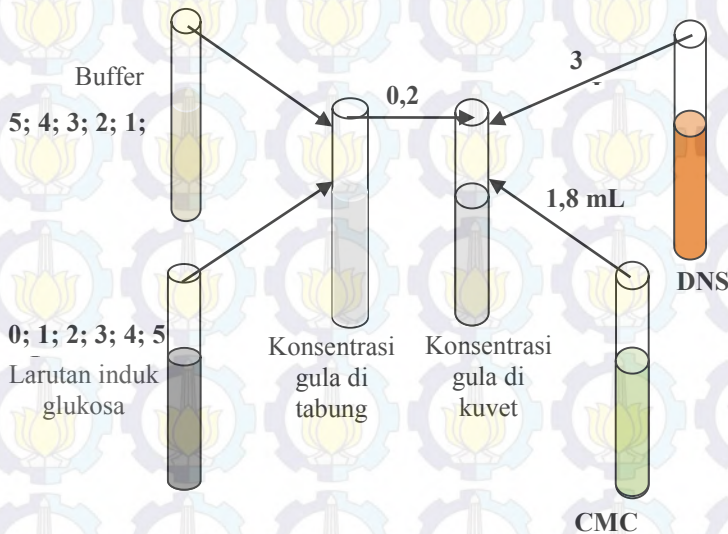
III.4.4.2 Pembuatan Larutan CMC (*Carboxymetil Cellulose*) (Widjaja, 2009)

Pembuatan larutan CMC langkah-langkahnya adalah, 2 gram CMC ditimbang kemudian dimasukkan ke erlemeyer. Setelah itu ditambahkan buffer sitrat dengan pH 5,5 sampai tepat 200 ml dan diaduk dengan stirrer selama 16 jam.

III.4.4.3 Pembuatan Kurva Standar Glukosa Untuk Mengukur Keaktifan Enzim Selulase (Widjaja, 2009)

Pada tahap pengujian ini langkah-langkah yang dilakukan adalah, pertama glukosa ditimbang 0,367 gram dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Kemudian ditambahkan buffer sitrat 0,1 M dengan pH 5,5 sampai tepat 100 ml ke dalam labu ukur. Larutan induk glukosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan larutan induk glukosa berturut-turut 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml dan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 sebanyak 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml, 0 ml. Selanjutnya sebanyak 0,2 ml dari tiap konsentrasi larutan diambil dan dimasukkan ke dalam larutan standar glukosa dan ditambahkan 1,8 ml CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi. Setelah itu diinkubasi pada suhu 35°C selama 10 menit dan ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya campuran tersebut divortek kemudian dipanaskan pada air

mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm. Terakhir membuat kurva kalibrasi dengan mengeplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi. Proses pembuatan kurva standar glukosa ditunjukkan pada gambar 3.3 berikut:



Gambar 3.3 Proses Pembuatan Kurva Standar Glukosa

III.4.5 Uji Aktifitas Enzim

III.4.5.1 Uji Aktifitas Enzim Selulase Sebelum Koreksi (Widjaja, 2009)

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim selulase tanpa purifikasi dan 1,8 mL larutan CMC dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C . Kemudian ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam larutan dan divortex hingga tercampur rata. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan dipanaskan pada air mendidih selama 10

menit, lalu didinginkan pada air es selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Larutan standarnya menggunakan 2 mL larutan CMC yang diperlakukan sama seperti sampel larutan enzim. Kemudian prosedur yang sama dilakukan pada enzim selulase setelah proses purifikasi.

III.4.6.2 Uji Aktifitas Larutan Koreksi Enzim Selulase (Widjaja, 2009)

Sebanyak 0,2 mL larutan enzim selulase tanpa purifikasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C . Kemudian ditambahkan 3 mL DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam larutan dan divortex hingga tercampur rata. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan dipanaskan pada air mendidih selama 2 menit, kemudian ditambahkan 1,8 mL larutan CMC. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan dipanaskan kembali pada air mendidih selama 10 menit, lalu didinginkan pada air es selama 10 menit. Kemudian setelah masing-masing larutan suhunya normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Larutan standarnya menggunakan 2 mL larutan CMC yang diperlakukan sama seperti sampel larutan enzim. Perhitungan aktifitas enzim dilakukan dengan cara menghitung selisih absorbansi larutan enzim dan larutan koreksi enzim, kemudian nilainya dikalikan dengan slope kurva standart glukosa. Kemudian prosedur yang sama dilakukan pada enzim selulase setelah proses purifikasi.

III.4.6 Modifikasi Chitosan dan Imobilisasi Enzim

III.4.6.1 Tahap Persiapan Glutaricdialdehyde (GDA) (Ghaffar, 2010)

Chitosan 0,1 gram yang terlarut didalam 100 mL larutan *buffer* sitrat pH 3 ditambahkan kedalam larutan GDA 10 mL.

Kemudian didiamkan didalam *incubator shaker* selama 4 jam pada temperature 37°C selanjutnya didiamkan kembali pada temperature 37°C selama 1 malam. Chitosan-GDA yang sudah jadi (material pendukung cross-linked) difiltrasi dari larutan dan dicuci sebanyak tiga kali dengan larutan *buffer* sitrat pH 3 sebanyak 5 ml.

III.4.6.2 Imobilisasi Enzim dengan Chitosan (Ghaffar, 2010)

Sebanyak 0.1 gram chitosan ditambahkan kedalam *crude enzyme* selulase yang telah diukur aktifitas dan kadar proteinnya. Proses imobilisasi dilakukan selama 24 jam pada temperature 37°C didalam *incubator shaker*. Campuran kemudian difiltrasi dan enzim yang tidak bereaksi dipisahkan dengan cara dicuci sebanyak 3 kali dengan larutan *buffer* sitrat pH 3 sebanyak 5 ml. Enzim selulase yang telah diimobilisasi kemudian disimpan pada suhu 4°C.

III.4.6.3 Imobilisasi Enzim dengan Chitosan-GDA (Ghaffar, 2010)

Sebanyak 0.1 gram material pendukung chitosan-GDA ditambahkan kedalam *crude enzyme* selulase yang telah diukur aktifitas dan kadar proteinnya. Proses imobilisasi dilakukan selama 4 jam pada temperature 37°C didalam *incubator shaker*. Campuran kemudian difiltrasi dan enzim yang tidak bereaksi dipisahkan dengan cara dicuci sebanyak 3 kali dengan larutan *buffer* sitrat pH 3 sebanyak 5 ml. Enzim selulase yang telah diimobilisasi kemudian disimpan pada suhu 4°C.

III.4.7 Uji Analisa Enzim Terimobilisasi

III.4.7.1 Persiapan Uji Analisa Enzim Terimobilisasi dengan Metode Bradford

Metode Bradford (Bradford, 1976) digunakan untuk menentukan kadar selulase didalam suatu larutan. Untuk membuat *dye reagent* larutkan 100 mg Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 didalam 50 ml etanol 95%, kemudian tambahkan 100 ml asam fosfat 85%. Campuran dihomogenkan sehingga warna biru yang

disebabkan CBB berangsur-angsur menghilang. Selanjutnya larutkan dengan akuades hingga 1 L dan saring larutan dengan kertas saring sebelum digunakan. Reagent Bradford setelah disaring berwarna cokelat cerah. Apabila belum berwarna cokelat cerah, proses filtrasi harus dilakukan kembali.

III.4.7.2 Prosedur Pembuatan Larutan Standar Protein (Bradford, 1976)

Larutan standar protein dibuat dengan menimbang 0.1 gram bovine serum albumin (BSA) kemudian melarutkannya dengan 100 ml aquades steril untuk mendapatkan larutan BSA dengan konsentrasi 1 mg/ml. Kemudian membuat larutan NaCl 0.15 M dengan cara melarutkan 5.844 gram NaCl dengan 666 ml aquades steril.

III.4.7.3 Analisa Enzim Terimobilisasi dengan Metode Bradford (Bradford, 1976)

Siapkan spektrofotometer sebelum digunakan, dilanjutkan dengan melarutkan 0.05 ml enzim selulase dengan 0.05 ml NaCl. Larutan kemudian divortex agar homogen. Selanjutnya menambahkan 5 ml *dye reagent* kedalam tube percobaan dan menginkubasi larutan selama 10 menit. Ukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm. Kurva standar dibuat dengan mengeplot konsentrasi protein didalam selulase terhadap absorbansinya. Larutan standar BSA dianalisa dengan menggunakan 5 ml *reagent* Bradford yang ditambahkan kedalam 0.1 ml larutan standar NaCl. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan ukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm.

III.4.8 Proses Hidrolisis Sabut Kelapa (Anwar, 2008)

III.4.8.1 Prosedur Pembuatan Kurva Standar Glukosa untuk Hidrolisis Glukosa

Pada tahap pengujian ini langkah-langkah yang dilakukan adalah, pertama glukosa ditimbang 0,367 gram dan dimasukkan kedalam

labu ukur 100 ml. Kemudian ditambahkan buffer sitrat 0,1 M dengan pH 5,5 sampai tepat 100 ml kedalam labu ukur. Larutan induk glukosa diencerkan pada berbagai macam konsentrasi (0:5; 1:4; 2:3; 3:2; 4:1; 5:0) dengan larutan induk glukosa berturut-turut 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml dan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 sebanyak 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml, 0 ml. Selanjutnya sebanyak 0,2 ml dari tiap konsentrasi larutan diambil dan dimasukkan kedalam larutan standard glukosa dan ditambahkan 1,8 ml aquades steril kedalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) kedalam tabung reaksi. Selanjutnya campuran tersebut divortex kemudian dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan menggunakan air es selama 10 menit dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm. Terakhir membuat kurva kalibrasi dengan mengplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

III.4.8.2 Prosedur Hidrolisis dengan Enzim Selulase Terimobilisasi (Anwar, 2008)

Pada tahap hidrolisis selulosa dan hemiselulosa menjadi glukosa langkah-langkahnya adalah, 1 gram sabut kelapa (100 mesh) yang sudah dilakukan *pretreatment* secara kimiawi (*didelignifikasi*) dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml. Kemudian ditambahkan enzim selulase hasil imobilisasi yang sudah di ketahui aktifitasnya sebanyak 18.6 U ke dalam sabut kelapa. Selanjutnya ditambahkan *buffer* sitrat 0,1 M pH 3 ke dalam larutan enzim dan sabut kelapa hingga *volume* mencapai 20 ml. Proses hidrolisis dilakukan dengan *incubator shaker* dengan kecepatan *shaker* 125 rpm suhu di jaga konstan 60°C. Hal yang sama dilakukan untuk tiap variable. Terakhir konsentrasi glukosa dianalisa dalam hidrolisat dengan metode DNS dan setiap selang waktu tertentu selama 48 jam.



Keterangan Gambar:

1. Pengatur RPM
2. Shaker
3. Pengatur Suhu

Gambar 3.3 Rangkaian Alat Hidrolisis Sabut Kelapa

III.4.9 Analisa Kadar Glukosa

III.4.9.1 Analisa Kadar Glukosa dengan Metode DNS (Anwar, 2008)

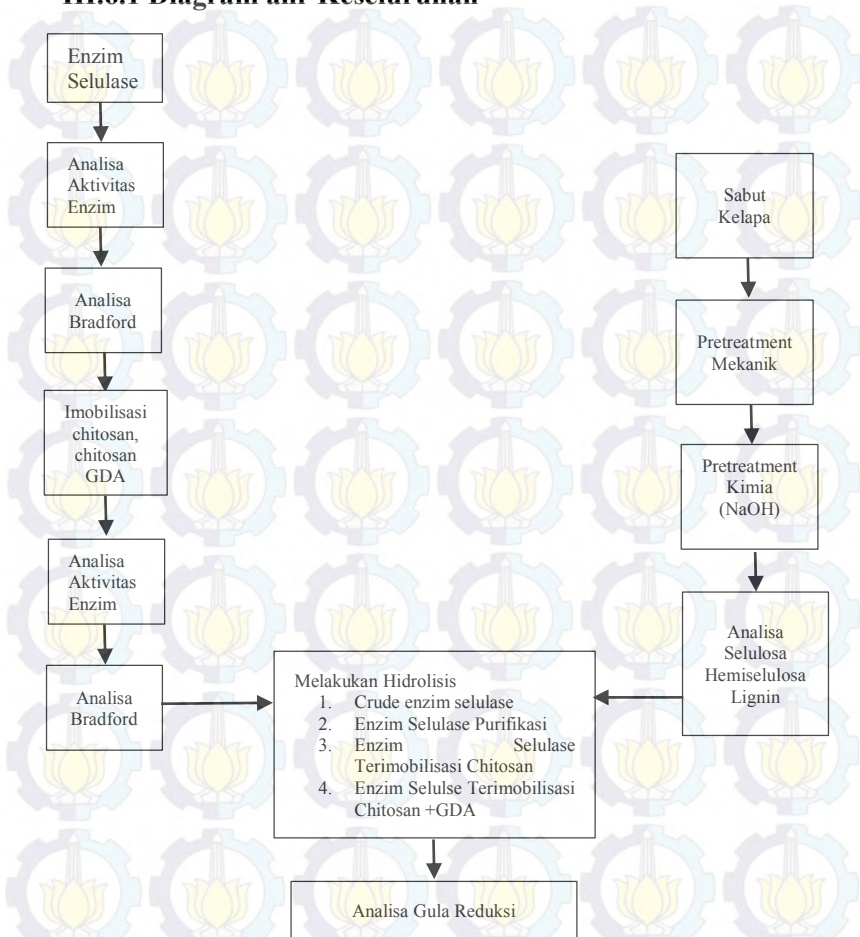
Sampel yang sedang di hidrolisis diambil 1 ml setiap selang 12 jam dan dimasukkan di microtube, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm untuk memisahkan endapan. Setelah disentrifugasi larutan diambil 0,2 ml dan ditambahkan 1,8 ml akuades ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 3 ml larutan DNS dan divortex agar tercampur merata. Selanjutnya dipanaskan dengan air mendidih selama 10 menit dan didinginkan dengan air es selama 10 menit. Kemudian setelah suhu larutan normal ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

III.5 Kondisi Operasi Penelitian

- Jenis Substrat : Sabut Kelapa
- Berat Substrat
 - Pretreatment : 50 gram
 - Hidrolisis : 1 gram
- Tekanan Hidrolisis : 1 atm
- pH
 - Persiapan enzim : 3
 - Pemurnian : 5,5
 - Imobilisasi : 3
 - Hidrolisis : 3
- Ukuran partikel substrat : 100 mesh
- Konsentrasi enzim hidrolisis : 18,6 U/1 gram Sabut Kelapa
- Suhu
 - Pretreatmen NaOH : 80°C
 - Persiapan Enzim : 30°C
 - Pemurnian : 4°C
 - Imobilisasi : 37°C
 - Hidrolisis : 60°C
- Waktu pretreatmen
 - NaOH 1% : 16 jam
 - Persiapan Enzim : 8 hari
 - Imobilisasi chitosan : 24 jam
 - Imobilisasi chitosan-GDA : 8 jam
- Waktu inkubasi : 24 jam
- Jenis carrier : chitosan
- Jenis strain : *A.niger*

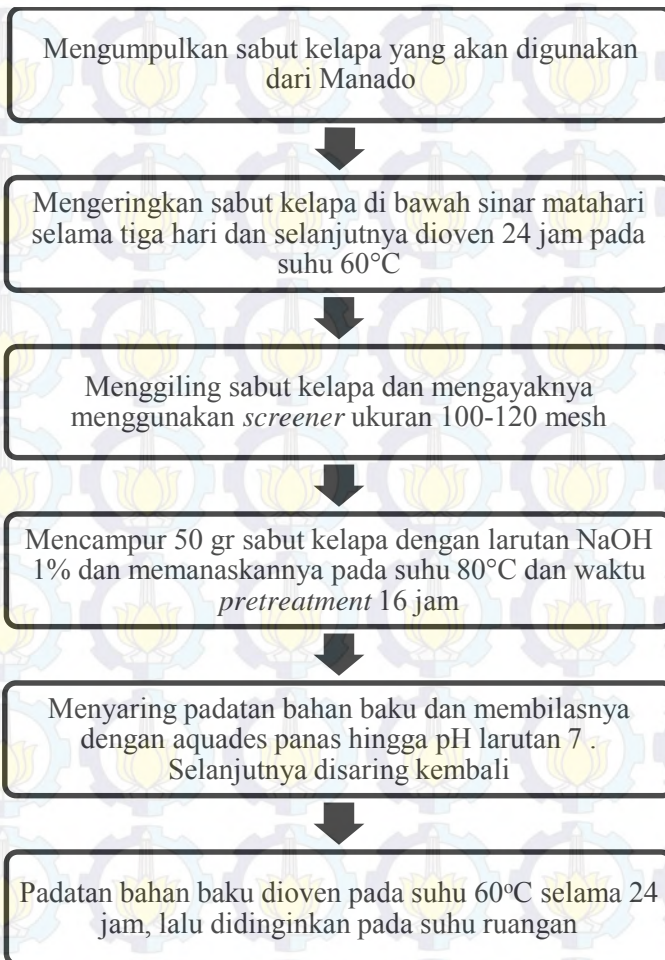
III.6 Diagram Alir Penelitian

III.6.1 Diagram alir Keseluruhan



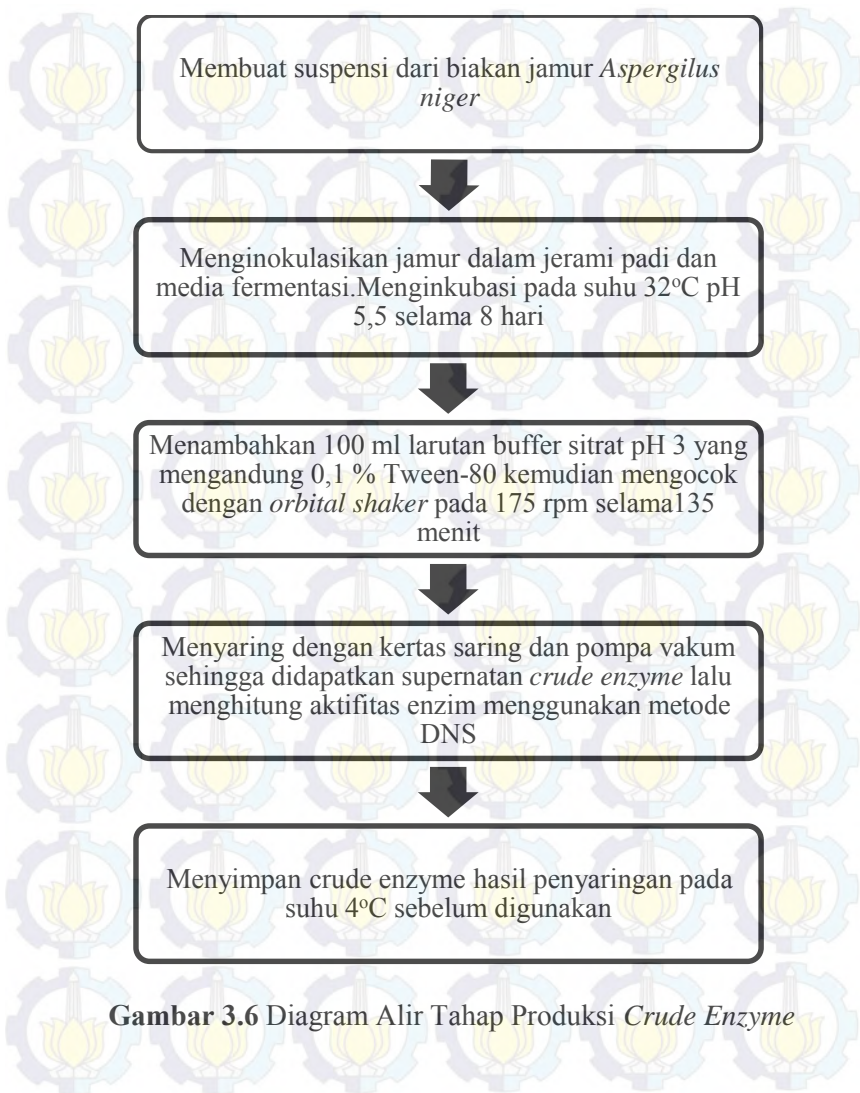
Gambar 3. 4 Diagram Alir Tahapan Keseluruhan Penelitian

III.6.2 Tahap *Pretreatment* Bahan Baku

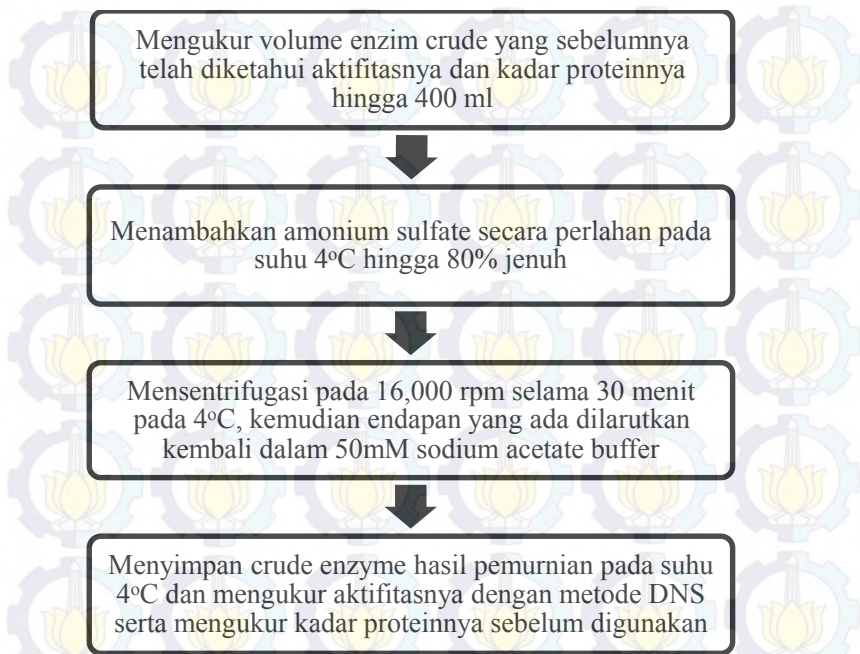


Gambar 3. 5 Diagram Alir Tahap *Pretreatment* Bahan Baku

III.6.3 Tahap Produksi *Crude Enzyme*

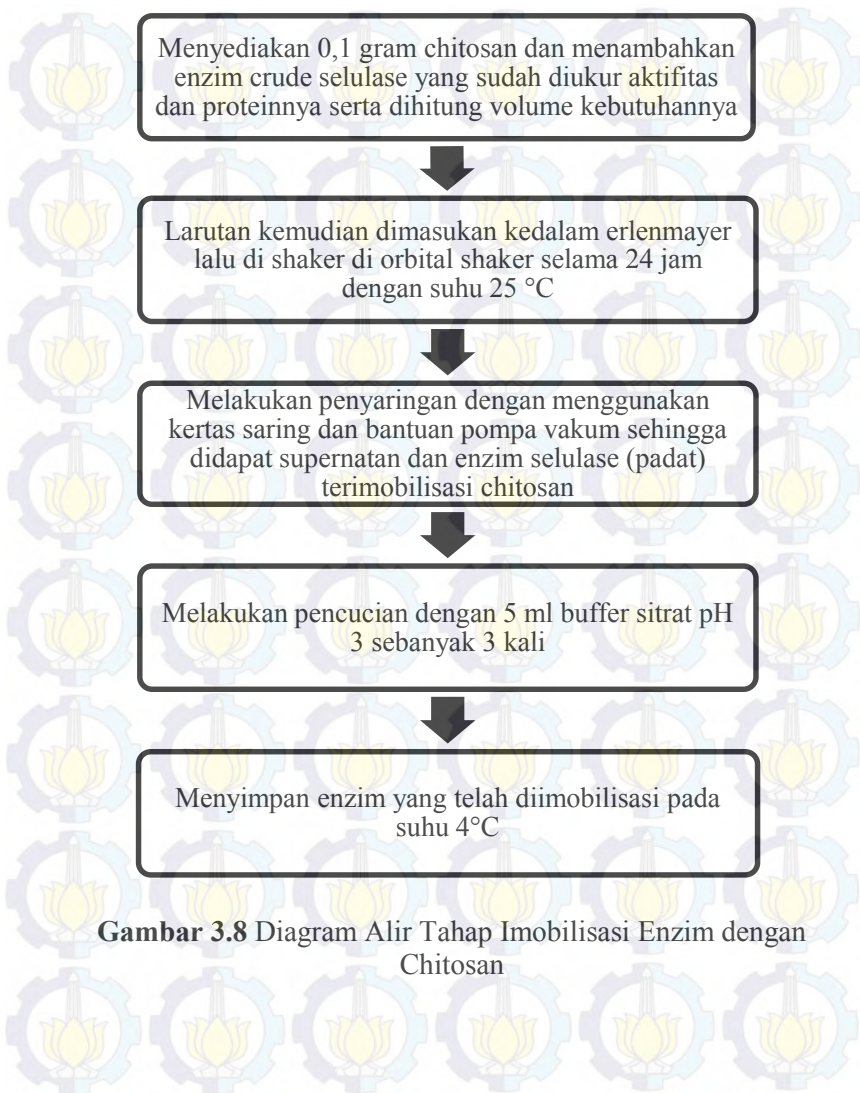


III.6.4 Tahap Pemurnian Enzim dengan Amonium Sulfat



Gambar 3.7 Diagram Alir Tahap Pemurnian Enzim dengan Amonium Sulfat

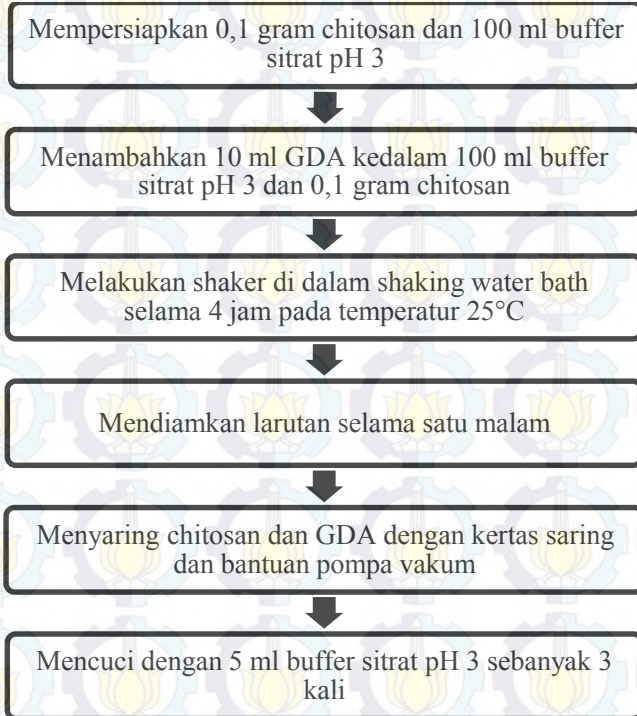
III.6.5 Tahap Imobilisasi Enzim dengan Chitosan



Gambar 3.8 Diagram Alir Tahap Imobilisasi Enzim dengan Chitosan

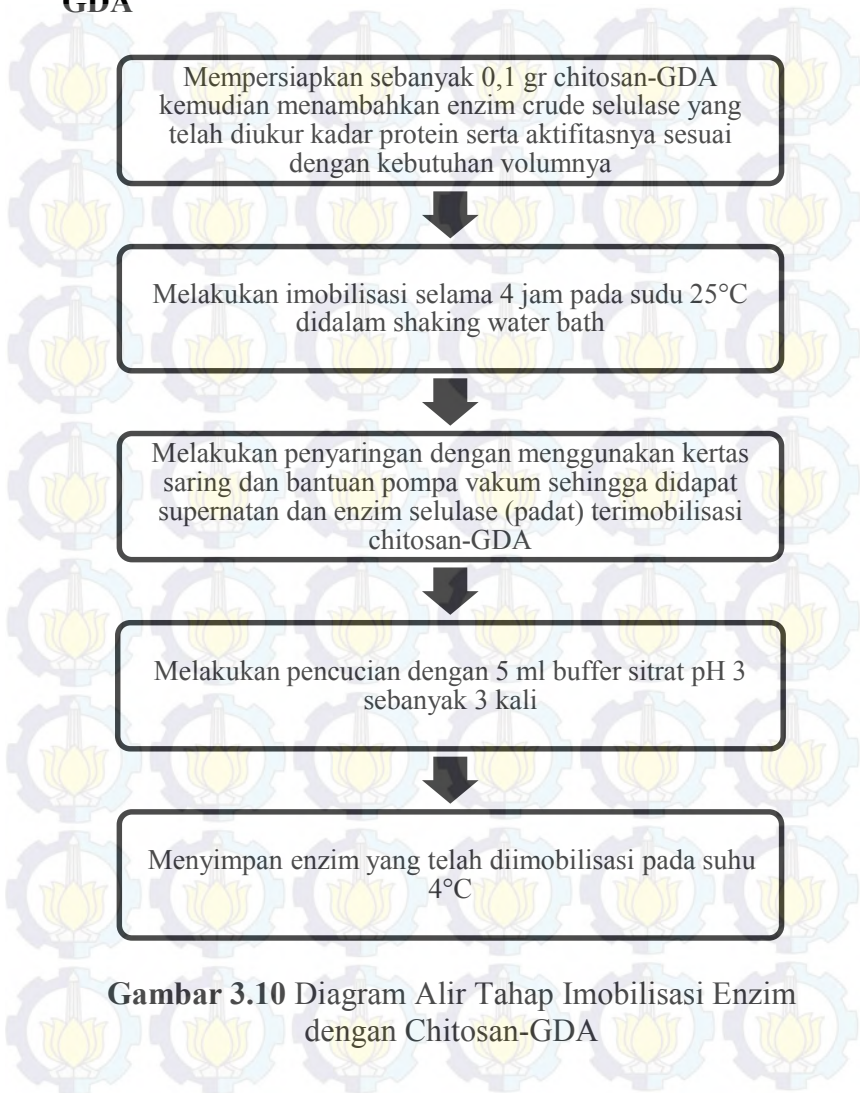
III.6.6 Tahap Imobilisasi Enzim dengan Chitosan-GDA

III.6.6.1 Tahap Persiapan Material Pendukung Chitosan-GDA

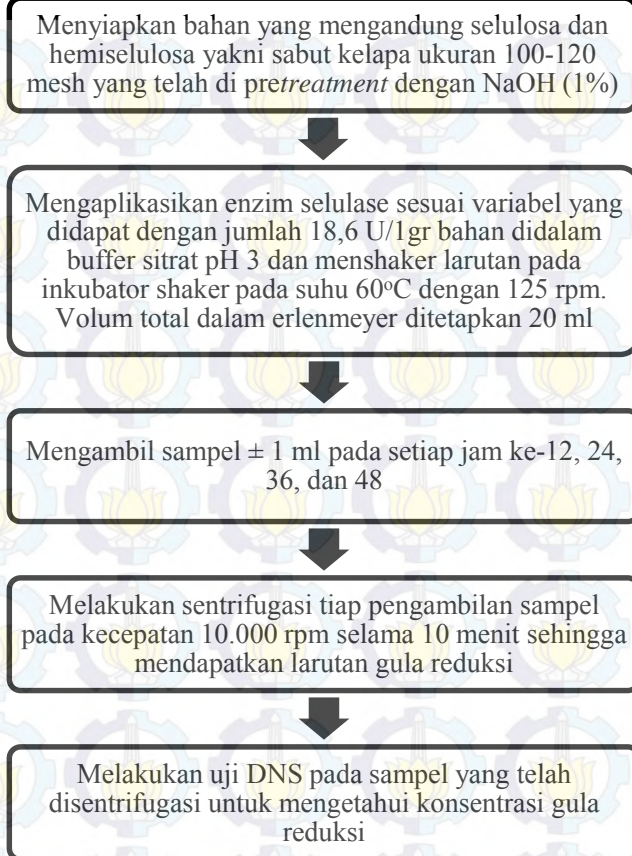


Gambar 3.9 Diagram Alir Tahap Persiapan Material Pendukung Chitosan-GDA

III.6.6.2 Tahap Imobilisasi Enzim dengan Chitosan-GDA

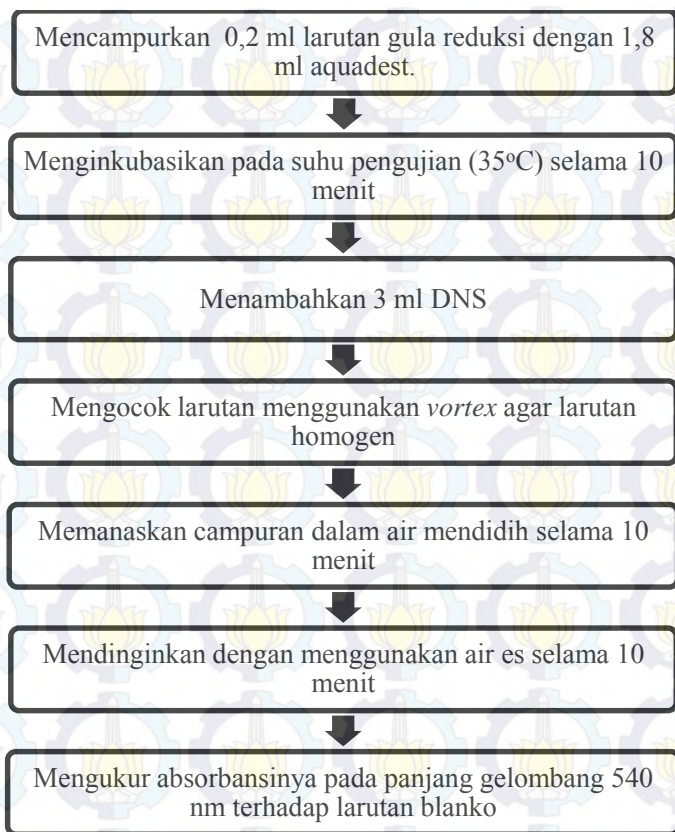


III.6.7 Tahap Hidrolisis Selulosa dan Hemiselulosa



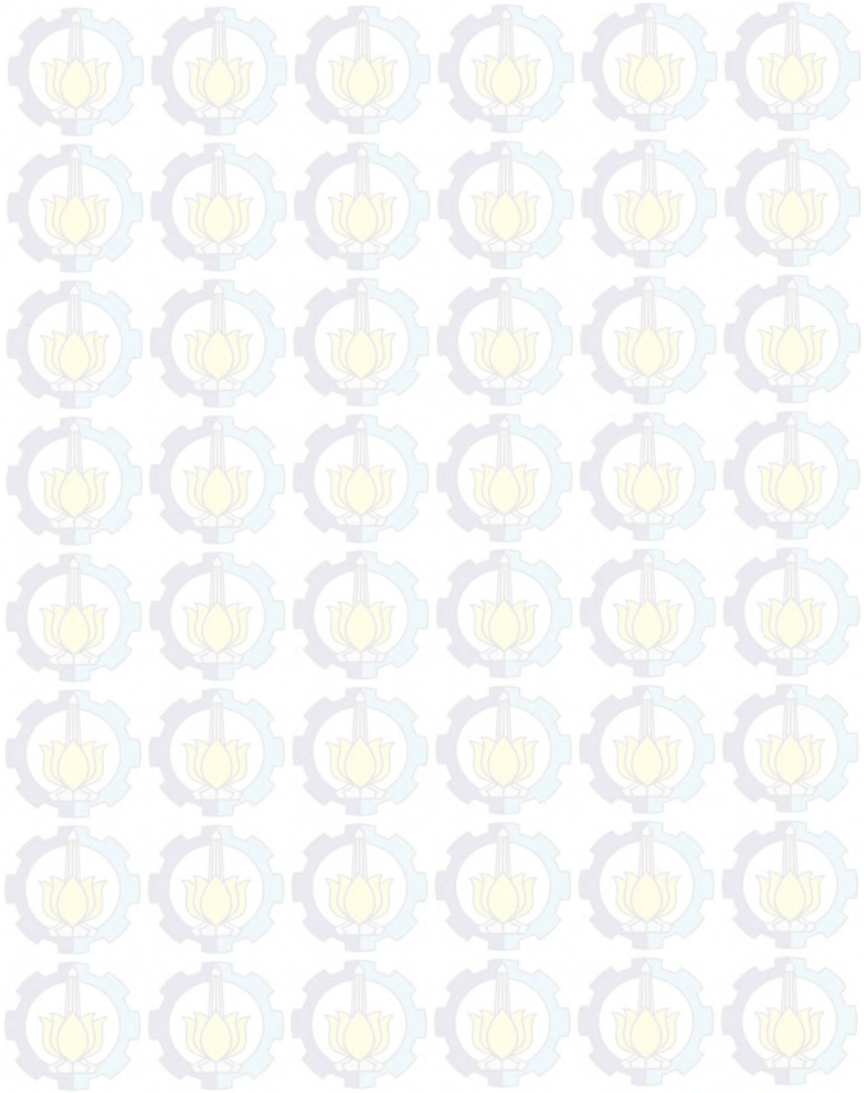
Gambar 3.11 Diagram Alir Tahap Hidrolisis Selulosa dan Hemiselulosa

III.6.8 Tahap Uji Konsentrasi Gula Reduksi



Gambar 3.12 Diagram Alir Tahap Uji Konsentrasi Gula Reduksi

(Halaman ini sengaja dikosongkan)



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan gula reduksi dari hidrolisis enzimatis sabut kelapa yang telah melalui proses pretreatment bahan baku dengan *crude* enzim terimobilisasi. Dalam penelitian ini, untuk mendapatkan hasil akhir gula reduksi, terdapat beberapa proses yang harus dilakukan:

1. Proses *pretreatment* mekanik dari sabut kelapa yang terdiri atas *pretreatment* mekanik dan kimiawi. Proses *pretreatment* mekanik bertujuan untuk memperluas permukaan sabut kelapa sehingga dapat mempermudah pada proses selanjutnya yakni proses pretreatment kimiawi dan proses hidrolisis dan proses *pretreatment* kimiawi bertujuan untuk memperkecil jumlah lignin yang terkandung didalam selulosa sehingga nantinya selulosa dan hemiselulosa dapat dengan mudah didegradasi
2. Tahap pembuatan *crude* enzim dari *Aspergillus niger*
3. Tahap pemurnian enzim dengan menggunakan *ammonium sulfate*
4. Tahap imobilisasi enzim dengan menggunakan membran chitosan
5. Tahap imobilisasi enzim dengan menggunakan membran chitosan yang telah dilakukan *cross-linking* terlebih dahulu dengan GDA
6. Tahap hidrolisis sabut kelapa dengan enzim selulase *crude*, enzim selulase yang telah dimurnikan, enzim selulase terimobilisasi dengan chitosan, dan enzim selulase terimobilisasi dengan chitosan-GDA

IV.1 Pretreatment Sabut Kelapa

Sabut kelapa dikeringkan dibawah sinar matahari selama 3 hari. Kemudian sampel tersebut digiling dengan menggunakan mesin penggiling. Sampel yang sudah berupa butiran-butiran dimasukkan kedalam oven selama 24 jam pada suhu 60°C. Setelah

dioven, sabut kelapa diayak untuk memperoleh ukuran 100 mesh, hal ini bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sehingga memudahkan mendegradasi selulosa dan hemiselulosa menjadi glukosa. (Anwar dkk., 2011).

Setelah pretreatment mekanik dilanjutkan dengan pretreatment kimiawi. Proses pretreatment kimiawi ini bertujuan untuk mengurangi jumlah lignin yang terkandung pada selulosa dengan menggunakan basa. Selulosa yang mengandung kadar lignin tinggi akan menghasilkan gula reduksi yang lebih kecil karena lignin bersifat kokoh dan melindungi selulosa dan hemiselulosa dari hidrolisis. Dengan mengurangi jumlah lignin pada selulosa, selulosa dan hemiselulosa akan lebih mudah diakses menyebabkan lebih mudahnya proses hidrolisis yang dilakukan dan jumlah gula reduksi yang dihasilkan lebih besar.

Komposisi selulosa sebelum dilakukan pretreatment kimiawi ditunjukkan pada tabel 4.1

Tabel 4.1 Komposisi Sabut Kelapa Tanpa Pretreatment Kimiawi

Komposisi Kimia	% wt (Hasil Penelitian ini)	% wt (Bilba dkk., 2007)
Hemiselulosa	21,92	10
Selulosa	18,63	22
Lignin	48,42	47

Pada tabel 4.1 dapat dilihat bahwa sabut kelapa memiliki 21,92% selulosa, 18,63% hemiselulosa, dan 48,42% lignin. Dari data tersebut, sabut kelapa mempunyai kandungan selulosa dan hemiselulosa yang dapat dikembangkan menjadi bahan baku untuk pembuatan gula reduksi. (Prado dkk., 2014)

Pada proses pretreatment kimiawi, tahapan yang dilakukan adalah menimbang 50 gram sabut kelapa yang sebelumnya telah mengalami pretreatment mekanik. Kemudian memasukan 50 gram sabut kelapa kedalam labu leher 3,

Menambahkan NaOH 1% sebanyak 10 ml dan menambahkan *aquadest* hingga 1000 ml. Campuran kemudian dipanaskan dan direflux pada suhu 80°C selama 16 jam.

Setelah proses *pretreatment* selesai, campuran kemudian didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Campuran sabut kelapa dan NaOH ini kemudian dipisahkan dengan cara disaring, dan sisa-sisa NaOH dicuci dengan *aquadest* steril hingga pH 7. Selanjutnya, padatan yang telah netral dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 60°C selama 24 jam. Kemudian, padatan didinginkan dan digiling kembali sebelum disimpan.

Ikatan silang dari struktur aromatik lignin mampu memperlambat penetrasi yang dilakukan oleh enzim. Larutan NaOH pada pretretmen kimiawi dapat menyerang dan merusak struktur lignin pada bagian kristalin dan amorf serta memisahkan sebagian hemiselulosa (Gunam dan Antara, 1999). Ion OH⁻ dari NaOH memutuskan ikatan-ikatan dari struktur dasar lignin, sedangkan ion Na⁺ akan berikatan dengan lignin membentuk natrium fenolat. Lignin yang terlarut ditandai dengan adanya warna hitam yang disebut lindi hitam (*black liqour*).

IV.1.1 Perbandingan Komposisi Kimia Sabut Kelapa Sebelum dan Sesudah *Pretreatment* Kimiawi

Sabut kelapa hasil *pretreatment* untuk setiap variabel dilakukan analisa untuk mendapatkan kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin (Datta dan Rathin, 1981). Pada analisa ini, digunakan asam sulfat 1N dan asam sulfat 72% + asam sulfat 1 N. asam sulfat 1 N digunakan untuk melarutkan hemiselulosa sedangkan campuran asam sulfat 72% + asam sulfat 1 N dapat melarutkan selulosa. Padatan kemudian diabukan untuk mendapatkan kadar lignin. Proses analisa diawali dengan mereflux 1 gram sampel dengan H₂O selama 1 jam pada suhu 100°C, padatan dikeringkan dan dioven selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan mereflux sampel dengan asam sulfat 1 N selama 1 jam pada suhu 100°C. Pada proses ini, asam sulfat 1 N akan melarutkan hemiselulosa yang terdapat pada sampel sehingga berat sampel yang telah

kehilangan kadar hemiselulosa dapat dihitung. Selanjutnya, sampel yang telah melalui *treatment* asam sulfat 1 N direflux kembali dengan campuran asam sulfat 72% + asam sulfat 1 N. Campuran asam sulfat 72% + asam sulfat 1 N ini akan melarutkan selulosa dalam sampel sehingga berat sampel yang telah kehilangan kadar selulosa dapat dihitung. Selanjutnya sampel diabukan, tujuannya adalah untuk menghilangkan kadar lignin dalam sampel sehingga berat lignin yang terkandung dalam sampel dapat dihitung. Data komposisi selulosa, hemiselulosa, dan lignin dari sabut kelapa sebelum dan sesudah *pretreatment* kimiawi ditunjukkan pada tabel 4.2 berikut:

Tabel 4.2 Persentase Komposisi Hemiselulosa, Selulosa, dan Lignin Sebelum dan Setelah *Pretreatment* Kimiawi

Variabel	Komposisi Kimia (% wt)		
	Hemiselulosa	Selulosa	Lignin
Unpretreatment	21,92	18,63	48,42
NaOH 1%	29.23	29.43	17.00

Pada tabel 4.2 dapat terlihat bahwa kadar lignin mengalami penurunan yang signifikan setelah dilakukannya *pretreatment* kimiawi. Hal ini menunjukkan bahwa basa (NaOH) mampu mendegradasi lignin sehingga dapat memudahkan proses hidrolisis enzimatis untuk menghasilkan gula reduksi.

IV. 2 Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus Niger*

Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah *crude* enzim yang berasal dari *Aspergillus niger* dengan substrat jerami padi dan *crude* enzim yang dimurnikan dari *Aspergillus niger* dengan substrat jerami padi. Ada tiga tahap dalam produksi enzim selulase dari *Aspergillus niger*. Tahapan awal dari produksi ini adalah tahap persiapan enzim. Di tahap persiapan enzim ini perlu dilakukan pengembangbiakan jamur *Aspergillus niger* pada media *potato dextrose agar* (PDA). PDA bubuk diambil sebanyak 3,9 gram dan ditambahkan agar batang sekitar 0,6 gram lalu dilarutkan ke dalam 100 ml aquades. Larutkan PDA ini kemudain dipanaskan

dan diaduk dengan stirer sampai agar batang benar-benar larut. Larutan PDA yang sudah larut kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi kurang lebih sebanyak 5 ml dan di masukan ke dalam autoclave pada suhu 121 °C sekitar 15 menit. Proses penyimpanan dalam autoclave selama 15 menit ini bertujuan agar mikroorganisme lain tidak tumbuh dan tidak menjadi kontaminan dalam tahap produksi *crude* enzim selanjutnya. Pada 121 °C endospora bakteri dapat dibunuh dalam waktu 4-5 menit oleh karena itu dipilih suhu ini untuk proses awal sterilisasi. Selanjutnya setelah proses autoclave, tabung reaksi diletakan pada posisi miring sampai larutan PDA memadat pada suhu ruang. *Aspergillus niger* diinokulasikan ke dalam larutan PDA di dalam laminar flow dan diletakan di dalam inkubator dengan suhu 30 °C selama 7 hari.

Aspergillus niger yang sudah siap selama 7 hari diinokulasikan kedalam erlenmeyer yang sebelumnya sudah ditambahkan jerami padi dan nutrien. Jerami padi ditambahkan kedalam erlenmayer kemudian diisi dengan garam mineral, *yeast extract* serta lautan buffer sitrat pH 5,5. Perbandingan jerami padi dan garam mineral yakni 5 gram : 25 ml. *Aspergillus niger* yang diinokulasikan ke dalam jerami padi sebanyak kurang lebih 2 cm². Jerami padi yang dipakai sebagai substrat ukurannya 100-120 mesh. Jerami padi dipilih sebagai substrat karena dapat menghasilkan enzim selulase dengan aktivitas tinggi (Mila , 2005). Jerami padi disini bertugas sebagai sumber karbon dan juga material yang merangsang aktivitas dan produktifitas enzim. Sementara, garam mineral merupakan nutrisi medium fermentasi yang berisi larutan mineral yang dibutuhkan bagi pertumbuhan jamur. Unsur N, K, dan P dalam media fermentasi berfungsi sebagai mineral penginduksi. pH 5,5 digunakan pada pembuatan enzim ini sebagai media penyetaraan pH. Menurut Winarno, 1995 enzim menunjukan aktivitas maksimal pada kisaran pH yang disebut pH optimum. Enzim selulase bekerja optimum di kisaran pH 5,5. Enzim akan mengalami denaturasi dan mengakibatkan kehilangan aktivitasnya bila bekerja di bawah atau di atas selang pH tersebut.

Erlenmeyer yang telah diisikan substrat, larutan mineral dan telah diinokulasikan jamur selanjutnya dimasukan kedalam inkubator. Proses menginkubasi ini dilakukan pada suhu 30 °C selama 8 hari. Waktu ini dipilih karena pertumbuhan optimal jamur *Aspergillus niger* selama 8 hari. Setelah itu, enzim yang dihasilkan diekstrak dengan menambahkan buffer sitrat 0,1 M pH sebanyak 100 ml yang mengandung 0,1 % Tween 80. Lalu enzim yang sudah diekstrak ini di *shaker* dengan orbital shaker selama 135 menit. Tween 80 disini berperan sebagai surfaktan yang fungsinya untuk menurunkan tegangan permukaan sel sehingga sel dapat dengan mudah mengeluarkan cairan metabolit yang ada didalamnya. Proses setelah inkubasi adalah proses sentrifugasi dengan suhu 4 °C kecepatan 8000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan larutan *crude* enzim. Kemudian dilanjutkan dengan filtrasi dengan kertas saring dan pompa vakum untuk memisahkan filtrat dengan mycelia beserta endapan media. Hasil berupa cairan bening berfungsi sebagai *crude* enzim dan digunakan dalam penelitian ini. Sedangkan untuk proses pembuatan enzim murni dapat dibuat dengan cara dilarutkan dalam larutan buffer sitrat pH 3.

IV.2.1 Tahap Pengujian Aktivitas dan Kadar Protein *Crude* Enzim

Setelah mendapatkan enzim maka selanjutnya dilakukan proses ketiga yakni proses pengujian enzim. Sebelum proses pengujian ini perlu dilakukan pembuatan kurva standar glukosa. Kurva standar glukosa dapat dibuat dengan cara melarutkan 0,367 gram glukosa dalam 100 ml buffer sitrat pH 5,5 didalam labu ukur. Kemudian mengencerkan larutan induk glukosa dengan larutan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5. Pengenceran larutan glukosa ini dilakukan di dalam tabung reaksi dengan berbagai konsentrasi yakni (0:5, 1:4, 2:3, 3:2, 4:1, 5:0). Dimana diambil larutan glukosa sebanyak 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml dan ditambahkan buffer sitrat pH 5 secara berurutan sebanyak 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml, 0 ml. Dari setiap tabung reaksi diambil sebanyak 0,2 ml sehingga

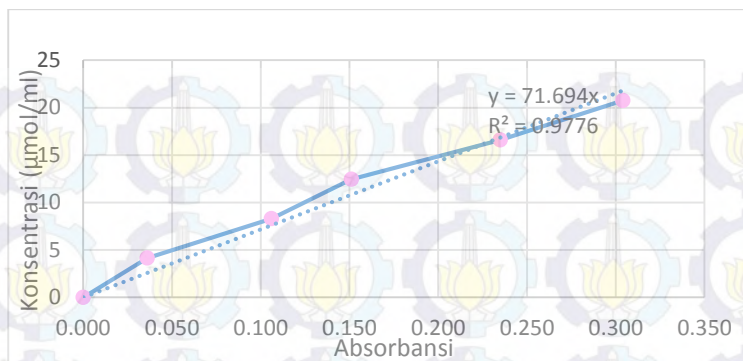
didapatkan 6 tabung reaksi baru dengan konsentrasi yang berbeda. Sebanyak 0,2 ml glukosa tadi ditambahkan dengan 1,8 CMC. Lalu diinkubasikan di dalam inkubator selama 10 menit dengan suhu 35 °C dan ditambahkan 3 ml DNS. Selanjutnya dipanaskan dengan suhu 100°C selama 10 menit dan didinginkan di dalam air es selama 10 menit. Setelah itu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Dari absorbansi yang didapatkan kemudian membuat kurva kalibrasi antara absorbansi dan glukosa. Kurva kalibrasi ini digunakan untuk menguji keaktifan enzim selulase.

Tabel 4.3 Perhitungan Kurva Standar Glukosa dengan CMC

Larutan Glukosa 0,024 M (ml)	Buffer (ml)	Diambil (ml)	CMC (ml)	V total (ml)	Konsentrasi (μmol/ml)	Absorbansi
					Di tabung	
0	5	0,2	1,8	5	0	0,000
1	4	0,2	1,8	5	4,15	0,036
2	3	0,2	1,8	5	8,3	0,106
3	2	0,2	1,8	5	12,45	0,151
4	1	0,2	1,8	5	16,6	0,235
5	0	0,2	1,8	5	20,75	0,304

Konsentrasi glukosa awal sebesar 20,75 μmol/ml

Dari tabel 4.3 dapat dibuat kurva standar glukosa dengan cara mengplot data konsentrasi glukosa dalam tabung sebagai sumbu y dan data absorbansi sebagai sumbu x. Selanjutnya ditarik regresi linier sehingga didapatkan suatu persamaan linier. Berikut adalah grafik kurva standar glukosa dari percobaan ini.



Gambar 4.1 Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) Untuk Menguji Aktivitas Enzim Selulase

Dari kurva pada gambar 4.1 diketahui persamaan regresi linier $y = 71,694 x$ dengan y sebagai konsentrasi glukosa dalam $\mu\text{mol/ml}$ dan x sebagai absorbansi. Yang berfungsi sebagai konversi data dari absorbansi menjadi glukosa yang digunakan untuk mengukur aktivitas enzim.

Dari kurva standar glukosa yang sudah didapat langkah selanjutnya adalah menguji aktivitas enzim. Aktivitas enzim ini diuji dengan metode DNS. Pengukuran aktivitas dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Kurva 4.1 diperoleh dari larutan glukosa yang ditambahkan dengan *Carboxymetil Cellulose* (CMC). CMC digunakan karena dapat dihidrolisis oleh enzim selulase dan menghasilkan glukosa. Dari glukosa yang dihasilkan dapat diuji aktivitas enzimnya. Pengujian dengan spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang 540 nm. Pada λ ini, reaksi gula reduksi dengan reagen DNS akan menghasilkan warna merah atau jingga setelah dipanaskan dan didinginkan. Warna ini yang akan terbaca absorbansinya (Miller, 1959)

Tabel 4.4 Aktivitas *Crude* Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* dengan Substrat Jerami Padi

Enzim	Absorbansi (A)			Konsentrasi ($\mu\text{mol/ml}$)	Slope	Aktivitas (U/ml)
	(A1)	(A2)	(A1-A2)			
Selulase 1	0,271	0,099	0,171	12,30	$71,694$	1,230
Selulase 2	0,229	0,006	0,223	16,03	$71,694$	1,603

Keterangan

A1 : Absorbansi larutan sebelum koreksi

A2 : Absorbansi larutan koreksi

(A1-A2) : Absorbansi larutan setelah koreksi

Dari tabel 4.4 dapat dilihat aktivitas dua *crude* enzim selulase dengan aktivitas yang berbeda yakni enzim selulase 1 dengan aktivitas 1,230 u/ml dan enzim selulase 2 dengan aktivitas sebesar 1,60 u/ml. Perbedaan kedua enzim ini diakibatkan berasal dari dua strain jamur *Aspergillus niger* yang berbeda. Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ferdian dan Nicholas (2015), aktivitas enzim pada penelitian ini jauh lebih baik. Dimana pada penelitian sebelumnya aktivitas yang didapat sebesar 0,483 U/ml.

Tabel 4.5 Aktivitas *Crude* Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* dengan Substrat Jerami Padi Sebelum Purifikasi dan Setelah Purifikasi

Enzim	Absorbansi (A)			Slope	Aktivitas (U/ml)
	(A1)	(A2)	(A1-A2)		
Selulase 3	0,267	0,043	0,224	71,694	1,605

(Sebelum Purifikasi)					
Selulase 3 (Setelah Purifikasi)	1,286	0,937	0,348	71,694	2,497

Keterangan

A1 : Absorbansi larutan sebelum koreksi

A2 : Absorbansi larutan koreksi

(A1-A2) : Absorbansi larutan setelah koreksi

Pada tabel 4.5 dapat dilihat data dari aktivitas enzim selulase 3 yakni sebesar 1,60 U/ml. Enzim selulase 3 ini adalah enzim yang selanjutnya dipurifikasi menggunakan garam amonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Setelah proses purifikasi dapat dilihat pada tabel 4.5 terjadi kenaikan aktivitas enzim selulase 3 menjadi 2,49 U/ml. Kenaikan aktivitas enzim ini diakibatkan proses pemurnian yang dilakukan oleh $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sehingga pengotor-pengotor yang ada pada *crude* enzim selulase 3 menjadi berkurang. Garam amonium sulfat mengikat air sehingga menyebabkan protein lebih aktif berinteraksi dan menghasilkan aktivitas enzim yang lebih tinggi.

Tabel 4.6 Aktivitas Enzim Selulase dari Enzim Selulase Murni

Enzim	Absorbansi (A)			Slope	Aktivitas (U/ml)
	(A1)	(A2)	(A1-A2)		
Enzim Murni	0,753	0,287	0,466	71,694	3,341

Keterangan

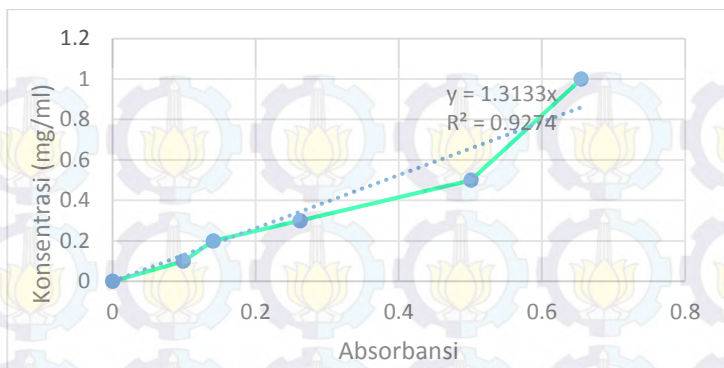
A1 : Absorbansi larutan sebelum koreksi

A2 : Absorbansi larutan koreksi

(A1-A2) : Absorbansi larutan setelah koreksi

Dari tabel 4.6 dapat dilihat nilai aktivitas enzim murni selulase yang diuji sebesar 3,341 u/ml. Berbeda dengan enzim sebelumnya yakni *crude* enzim selulase 1,2,3 yang telah diuji, aktivitas enzim murni pada tabel 4.6 memiliki nilai yang cukup besar. Hal ini sudah sesuai dikarenakan *crude* enzim mengandung banyak pengotor lain yang menyebabkan aktivitasnya menjadi lebih kecil. Dari hasil perhitungan aktivitas enzim ini selanjutnya dipakai untuk acuan perhitungan kebutuhan enzim untuk proses hidrolisis. Dimana sebelum proses hidrolisis akan dilakukan imobilisasi terlebih dahulu.

Selain pengujian aktivitas enzim, dilakukan pula uji bradford untuk mengetahui kadar protein dari masing-masing enzim sebelum dan sesudah hidrolisis. Pengujian kadar protein ini diawali dengan persiapan pembuatan *dye reagent* dan larutan standar protein. Setelah proses persiapan selesai dilakukan pembuatan kurva standar protein. Kurva standar protein dibuat dengan melarutkan 0.05 ml enzim selulase dengan 0.05 ml NaCl. Larutan kemudian divortex agar homogen. Selanjutnya menambahkan 5 ml *dye reagent* kedalam tube percobaan dan menginkubasi larutan selama 10 menit. Setelah itu mengukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm. Kurva standar dibuat dengan mengeplot konsentrasi protein didalam selulase terhadap absorbansinya. Larutan standar BSA dianalisa dengan menggunakan 5 ml *reagent* Bradford yang ditambahkan kedalam 0.1 ml larutan standar NaCl. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan ukur absorbansinya dengan panjang gelombang 595 nm.



Gambar 4.2 Kurva Standar Protein Untuk Menguji Kadar Protein dalam Enzim Selulase

Dari kurva pada gambar 4.2 diketahui persamaan regresi linier $y = 1,3133x$ dengan y sebagai konsentrasi protein (BSA) dalam mg/ml dan x sebagai absorbansi. Yang berfungsi sebagai konversi data dari absorbansi menjadi kadar protein. Selanjutnya dilakukan penghitungan data total protein melalui absorbansi yang didapatkan dari spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Data hasil uji Bradford dapat dilihat pada tabel 4.7

Tabel 4.7 Data Total Protein dalam Enzim Selulase yang Digunakan Setelah Dilakukan Uji Bradford

Enzim	Absorbansi	slope	Konsentrasi (mg/ml)	Volume (ml)	Protein (mg)
A	0,222	1,3133	5,840	32,2	188
B	0,108	1,3133	2,837	11,6	32,9

C	0,194	1,3133	2,86	400	2041,7
D	0,139	1,3133	2,04	400	584,9
E	0,46	1,3133	4,23	20	151,1

Keterangan:

- A : Enzim selulase 1 (imobilisasi)
- B : Enzim selulase 2 (hidrolisis)
- C : Enzim selulase sebelum pemurnian
- D : Enzim selulase setelah pemurnian
- E : Enzim murni

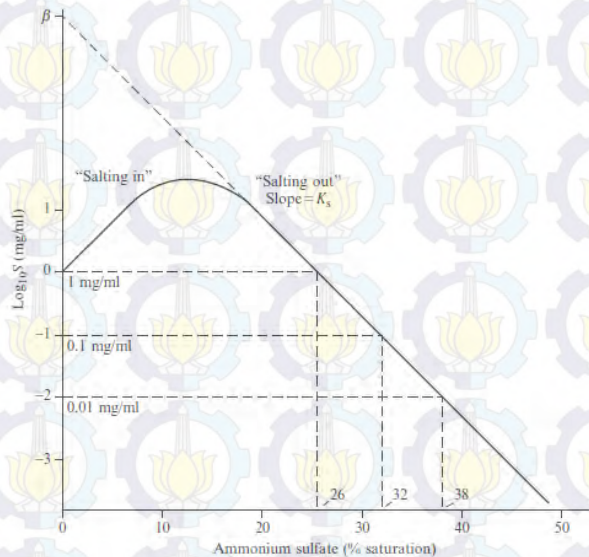
Selain mengukur aktivitas enzim pengukuran kadar protein adalah hal yang sangat penting dilakukan untuk mengetahui kualitas enzim. Enzim merupakan protein dimana aktivitas katalitiknya bergantung pada integritas strukturnya sebagai protein. Asam-asam amino yang menyusun enzim sangat mempengaruhi aktivitas katalitiknya sebagai enzim (Lehninger 1993).

IV.3 Pemurnian Enzim dengan *Ammonium sulfate*

Enzim selulase yang telah diuji aktivitasnya kemudian dipersiapkan untuk dimurnikan. Proses pemurnian ini bertujuan untuk memurnikan *crude* enzim selulase dari banyak pengotor yang nantinya dapat mengganggu kinerja dari enzim. Proses pemurnian ini dilakukan dengan menambahkan garam amonium sulfat $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ w/v kedalam enzim selulase. Prinsip pengendapan protein adalah kelarutan protein dalam larutan. Penambahan garam dilakukan dalam konsentrasi tinggi. Konsentrasi garam yang rendah meningkatkan kelarutan protein karena ion-ion berinteraksi dengan gugus bermuatan pada permukaan protein dan mengganggu dengan kekuatan elektrostatis yang kuat yang disebut proses *salting in* (Metzler, 2003).

Penambahan garam dalam konsentrasi tinggi menyebabkan molekul air yang semula terikat pada permukaan

hidrofobik protein kemudian berikatan dengan garam. Semakin banyak molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam mengakibatkan protein saling berinteraksi, teragregasi dan mengendap (*salting out*). Konsentrasi garam yang ditambahkan dinyatakan sebagai persen kejenuhan (Triana, 2013). Kurva proses pengendapan dapat dilihat pada Gambar 4.3 berikut



Gambar 4.3 Kurva Proses Pengendapan dengan *Ammonium sulfate* (Burgess, 2009)

Amonium sulfat dipilih sebagai garam untuk pengendapan protein karena ammonium sulfat merupakan garam yang memiliki kelarutan tinggi, tidak bersifat toksik, dan murah (Burgess, 2009). Amonium sulfat juga mampu mengendapkan protein dalam jumlah besar (Dennison, 2002). Hal ini dapat dilihat dari tabel 4.8 berikut

Tabel 4.8. Tabel Perbandingan dari Garam Pengendapan Protein untuk Purifikasi Enzim

Step	Vol (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Homogenate	900	43600	48000	1.1	1	100
pH 4.2 sinatant	650	4760	28000	5.9	5	58
(NH ₄) ₂ SO ₄ ppt	140	1008	18667	18.5	17	39
S-Sepharose	57	7.1	7410	1044	949	15
SephadexG-75	35	2.45	3266	1333	1211	7

From an isolation of cathepsin L by R. N. Pike.

Proses pemurnian ini diawali dengan mempersiapkan 400 ml enzim selulase yang terlebih dahulu sudah diukur aktivitas dan kadar proteinnya dengan metode DNS dan Bradford. Kemudian menambahkan *ammonium sulfate* secara perlahan kedalam enzim selulase dengan cara distirrer pada suhu 4 °C. Masa *ammonium sulfate* yang ditambahkan dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\frac{519.1(S_2 - S_1)}{100 - (0.3S_2)} \times \frac{V_{\text{selulase}}(\text{mL})}{1000 (\text{mL})}$$

Dimana 519.1 adalah koefisien pengendapan *ammonium sulfate* pada suhu 4 °C, S₂ adalah persen kejenuhan *ammonium sulfate* yang dituju sementara S₁ adalah persen *ammonium sulfate* awal dalam campuran. Karena volume selulase yang digunakan adalah 400 ml maka dengan mengendapkan hingga 80% jenuh, masa *ammonium sulfate* yang ditambahkan adalah 164 gram. Penambahan *ammonium sulfate* dilakukan secara perlahan agar larutan cepat homogen. Kemudian larutan dibiarkan selama semalam agar endapan terjadi secara maksimal. Endapan kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada suhu 4 °C dengan rpm 10.000. Endapan yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan 1/70 x volum buffer asetat 0.05 M pH 5.5 yakni 5,5 ml (Burgess, 2009).

Hasil dari proses pemurnian dapat dilihat pada tabel 4.9 berikut:

Tabel 4.9. Hasil Pemurnian *Crude Enzyme* Selulase

Jamur <i>Aspergillus Niger</i>	Rata-rata Aktivitas Enzim (U/ml)	Kelipatan Pemekatan	Kadar Protein (mg/ml)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Tingkat Kemurnian	Volum Enzim (ml)	Total Aktivitas
<i>Crude</i>	1,61	1	5,10	0,316	1.00	400	644
Supernatant	0,11	0,07	3,64	0,03	0.09	400	44
(NH ₄) ₂ SO ₄ ppt	2,49	1,56	1,46	1,705	5.39	5.5	13.8

Kelipatan pemekatan enzim selulase ditentukan dengan menghitung peningkatan aktivitas enzim selulase antara *crude* enzim dan enzim pekat hasil pengendapan. Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan mengukur konsentrasi gula pereduksi yang dihasilkan dari aktivitas enzim selulase menggunakan metode DNS.

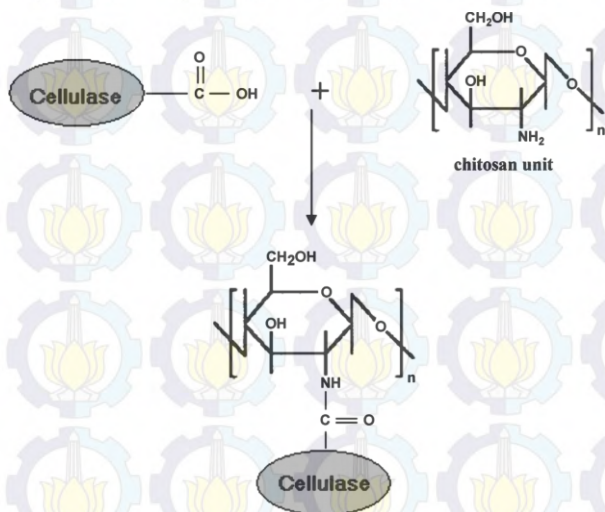
Aktivitas spesifik enzim diperoleh dengan membagi aktivitas enzim dengan kadar protein. Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode Bradford (Bradford, 1976). Aktivitas spesifik enzim menunjukkan tingkat kemurnian suatu enzim, semakin tinggi aktivitas spesifik suatu enzim maka semakin tinggi kemurnian enzim tersebut (Triana, 2005)

Dari tabel diatas dapat dilihat bahwa *ammonium sulfate* mampu memurnikan enzim hingga 5 kali lipat dari *crude enzyme* awal. Akan tetapi aktivitas totalnya jauh menurun apabila dibandingkan dengan aktivitas awal. Hal ini disebabkan enzim kehilangan aktivitasnya karena pengaruh pH dan temperatur serta enzim kehilangan kofaktor selama proses pemekatan. *Crude enzyme* hasil pemurnian ini kemudian digunakan untuk proses hidrolisis.

IV.4 Imobilisasi Enzim

IV.4.1 Imobilisasi Enzim dengan Chitosan

Proses imobilisasi enzim dilakukan dengan dua variabel yang telah ditentukan, variabel pertama yakni imobilisasi *crude* enzim dengan *chitosan*. Imobilisasi *crude* enzim selulase-chitosan dilakukan dengan menimbang 0,1 gram chitosan dalam bentuk *flakes* kemudian ditambahkan kedalam *crude* enzim selulase dari *A. niger* yang sudah diuji aktivitas dan kadar proteinnya.



Gambar 4.4 Mekanisme Reaksi Antara *Chitosan* dan Selulase (Ghaffar, 2010)

Imobilisasi dengan chitosan dilakukan menggunakan *crude* enzim selulase 1 dengan aktivitas sebesar 1,23 U/ml. *Crude* enzim selulase 1 dan chitosan diletakkan di dalam erlenmeyer 250 ml kemudian dimasukan kedalam inkubator shaker selama 24 jam. Suhu yang digunakan untuk proses imobilisasi ini adalah 25°C . Setelah didiamkan selama 24 jam enzim yang sudah bercampur dengan *chitosan* difiltrasi menggunakan bantuan pompa vakum

dan kertas saring. Selanjutnya enzim yang tidak bereaksi dipisahkan dengan chitosan yang sudah terimobilisasi dengan cara dicuci sebanyak 3 kali dengan menggunakan larutan buffer sitrat pH 3 masing masing sebanyak 5 ml. Enzim selulase yang telah diimobilisasi kemudian disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan.

Prosedur imobilisasi enzim dengan chitosan dapat dilihat pada gambar 4.5 berikut



Gambar 4.5 Prosedur Imobilisasi dengan Membran Chitosan

Untuk menguji keberhasilan dari imobilisasi *crude* enzim selulase menggunakan *chitosan*, dilakukan pengujian aktivitas *crude* enzim selulase setelah proses imobilisasi. Enzim selulase yang telah terimobilisasi dengan *chitosan* kemudian diambil supernatannya dan dilakukan pengujian dengan metode DNS. Dari hasil pengujian didapatkan perbandingan hasil antara aktivitas *crude* enzim sebelum dilakukan imobilisasi dan supernatan enzim setelah diimobilisasi. Data perbandingan ini dapat dilihat pada tabel 4.10

Tabel 4.10 Hasil Uji Aktivitas antara Enzim *Crude* dan Enzim Selulase Terimobilisasi Chitosan dengan Metode DNS (Widjaja, 2009)

Jenis Enzim	Konsentrasi	Aktivitas (units/ml)	Volume (ml)	Aktivitas total (units)
<i>Free</i>	12,30	1,23	32,2	39
Chitosan	7,90	0,79	32,2	25,4

Dari tabel 4.10 dapat dilihat bahwa aktivitas total *free* enzim sebesar 39 unit sementara untuk supernatan dari chitosannya sendiri aktivitasnya mencapai 25,4 unit. Dari data ini diketahui bahwa aktivitas supernatan dari *crude* enzim selulase setelah diimobilisasi mengalami penurunan sebesar 35%. Penurunan ini dilihat dari aktivitas total supernatan yang terbawa cukup besar yakni 25,4 unit. Rendahnya nilai aktivitas enzim selulase diduga karena terjadinya faktor pembagian (*partitioning*). Penambahan matriks *chitosan* membuat enzim mengalami *partitioning* dan mengurangi aktivitas awalnya secara signifikan. Ini juga didukung oleh Klibanov 1983 diacu dalam Said, Muljono 1989 yang menyatakan enzim terimobilisasi umumnya mempunyai aktivitas yang lebih rendah dibanding dengan enzim bebasnya. Terdapat beberapa hambatan yang terjadi jika enzim berada dalam bentuk imobil. Hambatan yang menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas pada enzim imobil antara lain, pengaruh pembagian (*partitioning*), pengaruh hambatan difusi dan pengaruh hambatan sterik.

Selain membandingkan aktivitas enzim selulase sebelum dilakukan imobilisasi dan supernatan setelah imobilisasi juga dilakukan pengujian kadar protein menggunakan metode Bradford terhadap supernatant dari enzim selulase setelah dilakukan imobilisasi. Pengujian protein ini dilakukan untuk mendukung kebenaran data dari aktivitas *crude* enzim yang telah diimobilisasi. Data hasil protein ini dapat dilihat pada tabel 4.11

Tabel 4.11 Hasil Uji Kadar Protein Enzim *Crude* dan Enzim Selulase Terimobilisasi Chitosan dengan Metode Bradford (Bradford, 1976)

Jenis Enzim	Konsentrasi Protein (mg/ml)	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total Protein Terabsorb (mg)
<i>Free</i>	5,840	32,2	188,04	11,84
Chitosan	5,472	32,2	176,20	

Dari tabel 4.11 dapat dilihat perbandingan konsentrasi protein pada *free* enzim selulase dan pada supernatan *crude* enzim selulase yang sudah diimobilisasi dengan *chitosan*. Total protein pada *free* enzim sebesar 188,04 mg dan setelah diimobilisasi didapatkan total protein yang tersisa pada supernatan enzim chitosan ini sebesar 176,20 mg. Kedua data ini menunjukkan adanya hubungan dimana selisih dari total protein *free* enzim dan supernatan enzim selulase yang sudah diimobilisasi adalah data jumlah protein yang terabsorb pada chitosan yakni sebesar 11,84 mg. Jika dihitung dalam persentase jumlah protein yang terarsorb didalam chitosan hanya sekitar 6,29%. Perbandingan antara jumlah protein yang terserap juga mendukung data dari aktivitas enzim yang sudah dihitung pada tabel 4.10. Hal ini menunjukkan chitosan memang mampu menyerap protein dari enzim selulase yang diimobilisasi meski dalam jumlah kecil. Menurut Knorr (1984) chitosan mampu mengikat air dan minyak karena mempunyai gugus polar dan non polar. Jumlah air yang dapat diikat chitosan sekitar 325-440 (w/w). Kemampuan pengikatan tersebut yang membuat chitosan dapat bertindak sebagai penstabil dan pengental serta digunakan dalam proses imobilisasi.

Rendahnya kandungan protein enzim yang tertahan diduga berhubungan dengan daya serap atau daya ikat dari matriks *chitosan*. *Chitosan* diduga mengikat bahan-bahan yang tersuspensi dalam larutan enzim seperti anion polisakarida dan senyawa pengotor lainnya terlebih dahulu karena memiliki bobot molekul yang lebih rendah, sedangkan protein dari enzim selulase tidak mampu diserap secara maksimal (Suhartono 1991). Selektifitas pengikatan molekul ini memungkinkan matriks kitosan dengan

konsentrasi rendah akan cepat jenuh oleh bahan-bahan tersuspensi yang berbobot molekul rendah dibandingkan dengan kitosan konsentrasi tinggi yang masih dapat mengikat protein enzim secara lebih baik.

Untuk membandingkan kualitas *crude* enzim dengan enzim murni dilakukan metode imobilisasi dengan perlakuan yang sama menggunakan enzim murni. Didapatkan nilai aktivitas Enzim murni bebas sebelum dilakukan imobilisasi dan supernatan enzim murni setelah dilakukan imobilisasi. Data aktivitas yang dilakukan menggunakan metode DNS dapat dilihat pada tabel 4.12

Tabel 4.12 Hasil Uji Aktivitas antara Enzim Murni dan *Supernatant* Enzim Selulase Murni Terimobilisasi Chitosan dengan Metode DNS (Widjaja, 2009)

Jenis Enzim	Konsentrasi	Aktivitas (units/ml)	Volume (ml)	Aktivitas total (units)
<i>Free</i>	33,41	3,34	20	66,8
Chitosan	22,60	2,26	20	45,39

Dari table 4.12 Didapatkan aktivitas total per unit enzim selulase murni yakni 66,8 unit sedangkan setelah diimobilisasi dengan chitosan aktivitas supernatan enzim ini berkurang menjadi 45,39 unit. Jika dibandingkan dengan aktivitas enzim *crude* pada tabel 4.10 aktivitas enzim murni pada tabel 4.12 nilainya jauh lebih besar. Namun nilai aktivitas total enzim yang terserap ke dalam chitosan tidak terlalu berbeda jauh. Selisih dari aktivitas total enzim yang bebas dan aktivitas supernatant dari chitosan adalah nilai dari aktivitas enzim selulase yang terserap pada material chitosan. Untuk nilai aktivitas total yang terserap pada enzim *crude* didapatkan sebesar 35 % sedangkan jika dilihat dari tabel 4.12 aktivitas enzim murni yang terserap hanya sebesar 32%. Kecilnya aktivitas bisa disebabkan tidak aktifnya sisi enzim saat dilakukan proses imobilisasi. Enzim yang terikat oleh matriks penyangga (support) kemungkinan besar aktivitasnya dapat menurun (Chibata 1978), hal ini dapat disebabkan oleh beberapa hal seperti : a)

molekul enzim terimobilisasi berada dalam konfigurasi yang menghalangi substrat masuk ke sisi aktif enzim; b) grup reaktif pada sisi aktif enzim mungkin dilibatkan dalam pengikatan dengan penyangga; c) molekul enzim selama pengikatan berada dalam konfigurasi inaktif; d) kondisi reaksi pengikatan mungkin mengakibatkan denaturasi dan inaktivasi enzim. Untuk mendukung nilai aktivitas ini maka dilakukan kembali uji Bradford untuk enzim selulase murni. Data hasil uji protein ini dapat dilihat pada tabel 4.13

Tabel 4.13 Hasil Uji Kadar Protein Enzim Murni dan Enzim Selulase Murni Terimobilisasi Chitosan dengan Metode Bradford (Bradford, 1976)

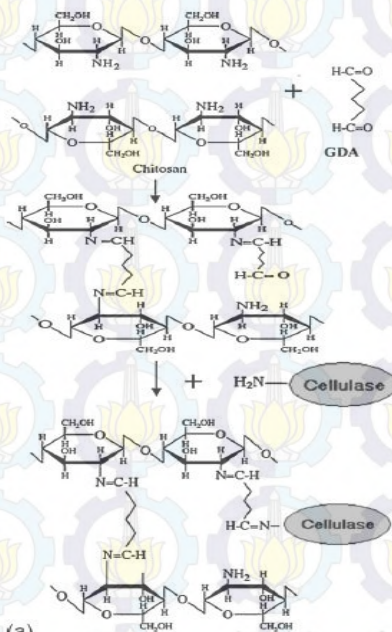
Jenis Enzim	Konsentrasi Protein (mg/ml)	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total Protein Terabsorb (mg)
<i>Free</i>	7,556	20	151,18	52,36
Chitosan	4,938	20	98,76	

Pada tabel 4.13 Dapat dilihat nilai total protein yang terabsorb dari enzim murni yang dilakukan imobilisasi sebesar 52,36 mg atau sebesar 37 % dari total protein awal. Hal ini membuktikan chitosan memang mempunyai kemampuan untuk menyerap protein dan menjadi material pendukung dalam mengimobilisasi enzim meskipun nilainya tidak terlalu besar.

IV.4.2 Proses Imobilisasi *Enzyme* Selulase dengan Chitosan-GDA (1%)

Proses imobilisasi antara *crude enzyme* selulase dengan chitosan-GDA adalah proses imobilisasi yang menggunakan dua teknik imobilisasi, yakni dengan ikatan silang (cross linking) antara chitosan dengan GDA untuk pengaktifan membran chitosan yang kemudian dilanjutkan dengan ikatan kovalen antara membran chitosan-GDA dengan *crude enzyme* selulase. Membran yang teraktifasi oleh GDA memungkinkan terbentuknya ikatan kovalen

antar membran. Hal ini dikarenakan chitosan memiliki gugus fungsional amino dan hidroksil yang bisa dimodifikasi secara kimia (Krajewska, 2004 dan Pillai dkk, 2009).



Gambar 4.6 Mekanisme Reaksi antara Chitosan dengan GDA dan Chitosan-GDA dengan Selulase (Ghaffar, 2010)

Proses imobilisasi ini diawali dengan mempersiapkan membran pendukung untuk imobilisasi. Proses persiapan membran pendukung diawali dengan menimbang 0,1 gram chitosan. Kemudian menempatkan chitosan ke dalam Erlenmeyer 250 ml, dan menambahkan 10 ml *glutaricdialdehyde* (GDA). Proses imobilisasi ini dilakukan didalam 100 ml buffer sitrat pH 3. Buffer sitrat pH 3 berfungsi untuk mengkondisikan agar material pendukung memiliki pH yang sama dengan enzyme yang akan digunakan dalam proses hidrolisis. Proses imobilisasi dilakukan dengan menggunakan orbital shaker pada suhu 24°C selama 4 jam.

Setelah itu campuran material pendukung chitosan-GDA didiamkan semalam. Hal ini dilakukan agar proses pengikatan (*cross linking*) antara chitosan-GDA dengan enzim selulase berjalan dengan maksimal (Ghaffar, 2010). Setelah mendiapkan material pendukung chitosan-GDA selama semalam, campuran disaring dengan menggunakan kertas saring whittman dengan bantuin pompa vakum. Pompa vakum digunakan untuk membantu proses penyaringan agar lebih maksimal dalam waktu yang efisien.

Proses imobilisasi kemudian dilakukan dengan menimbang 0,1 gram material pendukung chitosan-GDA yang sebelumnya telah dipersiapkan. Kemudian menambahkan *crude enzyme* selulase yang sebelumnya telah diukur aktivitasnya dan juga telah diukur kadar proteinnya terlebih dahulu dengan metode Bradford. Campuran kemudian dishaker dengan menggunakan orbital shaker pada suhu 24°C selama 4 jam. Setelah proses imobilisasi selesai, campuran kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring whittman dengan bantuin pompa vakum. Padatan enzim selulase kemudian disimpan pada suhu 4°C sebelum digunakan (Ghaffar, 2010)

Skema prosedur imobilisasi dengan membran chitosan-GDA dapat dilihat pada gambar 4.7 berikut



Tabel 4.14 Hasil Uji Kadar Protein Enzim *Crude* dan Enzim Selulase Terimobilisasi Chitosan-GDA dengan Metode Bradford (Bradford, 1976)

81

Chitosan-GDA	4,544	32,2	146,32	
--------------	-------	------	--------	--

Dari tabel 4.14 dapat dilihat bahwa total protein yang terkandung antara enzim *crude* tanpa imobilisasi dengan *supernatant* dari enzim selulase terimobilisasi chitosan-GDA mengalami penurunan. Total protein terabsorb dihitung dengan cara pengurangan antara total protein dari enzim *crude* dengan *supernatant* dari enzim terimobilisasi chitosan-GDA. Total protein yang terabsorb tidak besar yakni hanya 41,72 mg dari total protein awal 188,04 mg. Persentase total protein yang terabsorb adalah 22,19%. Total protein yang terabsorb menunjukkan bahwa membran chitosan-GDA mampu menyerap protein dari enzim selulase, hal ini juga menunjukkan bahwa enzim selulase dapat terimobilisasi dengan membran chitosan-GDA.

Kemudian aktivitas antara enzim *free* dan *supernatant* enzim selulase terimobilisasi chitosan-GDA juga diukur dengan menggunakan metode DNS (Widjaja, 2009) dan hasilnya ditunjukkan pada tabel 4.15 berikut

Tabel 4.15 Hasil Uji Aktivitas antara Enzim *Crude* dan Enzim Selulase Terimobilisasi Chitosan-GDA dengan Metode DNS (Widjaja, 2009)

Jenis Enzim	Konsentrasi	Aktivitas (units/ml)	Volume (ml)	Aktivitas total (units)
<i>Free</i>	12,30	1.230	32.2	39
Chitosan-GDA	8,62	0.862	32.2	28

Pengujian aktifitas ini dilakukan dengan mengukur absorbansi dari enzim *crude* sebelum imobilisasi dan *supernatant* dari enzim selulase terimobilisasi chitosan-GDA. Pengukuran dilakukan pada *supernatant* disebabkan karena sulitnya melakukan uji DNS pada enzim selulase terimobilisasi chitosan-GDA karena

dalam fasa padatan serta massa enzim selulase terimobilisasi chitosan-GDA yang sedikit. Enzim selulase terimobilisasi chitosan-GDA selanjutnya akan digunakan untuk hidrolisis sehingga apabila massanya semakin sedikit, proses hidrolisis tidak akan maksimal. Dari tabel 4.15 dapat dilihat bahwa aktivitas mengalami penurunan antara enzim *crude* sebelum imobilisasi dengan enzim selulase terimobilisasi chitosan-GDA. Penurunan aktivitas total yang terjadi sebesar 28,20%. Enzim selulase terimobilisasi chitosan-GDA yang telah terimobilisasi selanjutnya digunakan untuk proses hidrolisis enzimatis dengan sabut kelapa.

Prosedur yang sama juga dilakukan pada enzim murni dari *A.Niger*. Imobilisasi dilakukan pada enzim murni sebagai pembandingan antara imobilisasi dengan enzim *crude* dan imobilisasi dengan enzim murni. Hasil pengukuran kadar protein dengan metode Bradford pada enzim murni dapat dilihat pada tabel 4.16 berikut

Tabel 4.16 Hasil Uji Kadar Protein Enzim Murni dan Enzim Selulase Murni Terimobilisasi Chitosan-GDA dengan Metode Bradford (Bradford, 1976)

Jenis Enzim	Konsentrasi Protein (mg/ml)	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Total Protein Terabsorb (mg)
<i>Free</i>	7,556	20	151,12	38,35
Chitosan-GDA	3,222	20	112,77	

Dari tabel 4.16 dapat dilihat bahwa total protein yang terabsorb oleh membran chitosan-GDA juga tidak besar yakni hanya 38,35 mg dari total protein awal 151,12 mg atau sekitar 24,39%. Akan tetapi hal ini tetap menunjukkan bahwa membran chitosan mampu menyerap protein dari enzim selulase murni dan merupakan salah satu hal yang menunjukkan keberhasilan imobilisasi antara enzim selulase dengan membran chitosan-GDA.

Kemudian aktivitas antara enzim murni dengan *supernatant* juga diuji dengan menggunakan analisa DNS. Hasil dari uji aktivitas ditunjukkan pada tabel 4.17 berikut

Tabel 4.17 Hasil Uji Aktivitas antara Enzim Murni dan *Supernatant* Enzim Selulase Murni Terimobilisasi Chitosan-GDA dengan Metode DNS (Widjaja, 2009)

Jenis Enzim	Konsentrasi	Aktivitas (units/ml)	Volume (ml)	Aktivitas total (units)
<i>Free</i>	33,41	3,34	20	66,8
Chitosan-GDA	21,67	2,167	20	43,33

Dari tabel 4.17 dapat dilihat bahwa aktivitas antara enzim murni dengan *supernatant* enzim selulase murni terimobilisasi dengan chitosan-GDA menurun sangat jauh. Penurunan aktivitasnya mencapai 35% dari aktivitas total awal. Jumlah protein tertahan yang tinggi dengan aktivitas spesifik yang rendah diduga dipengaruhi oleh stabilitas operasional. Kondisi operasional yang tidak stabil dapat menyebabkan denaturasi protein enzim dan molekul penyangga karena kecepatan aliran substrat atau pelarut lainnya selain disebabkan oleh perubahan pH, suhu, kekuatan ion dan kondisi fisik lainnya (Suhartono 1989). Enzim selulase murni yang telah terimobilisasi dengan chitosan-GDA kemudian digunakan untuk proses hidrolisis enzimatik.

Dari kedua data imobilisasi dapat diketahui bahwa proses imobilisasi *crude* enzim selulase dengan matriks *chitosan*-GDA memiliki nilai yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan imobilisasi *cude* enzim selulase hanya dengan menggunakan matriks chitosan. Miao dan Swee (2000) menyatakan bahwa enzim dan kitosan sulit berikatan secara langsung, oleh karena itu diperlukan glutaraldehid sebagai jembatan penghubung. Gugus amino dari kitosan akan berikatan dengan gugus aldehid dari glutaraldehid, demikian juga gugus amino dari enzim akan

berikatan dengan gugus aldehid sehingga membentuk suatu jalinan *gusus amino-pereaksi-molekul enzim*. Proses pembentukan ikatan silang (*cross-linking*) yang tepat memungkinkan aktivitas enzim imobil yang dihasilkan cukup tinggi.

IV.5 Hidrolisis Sabut Kelapa

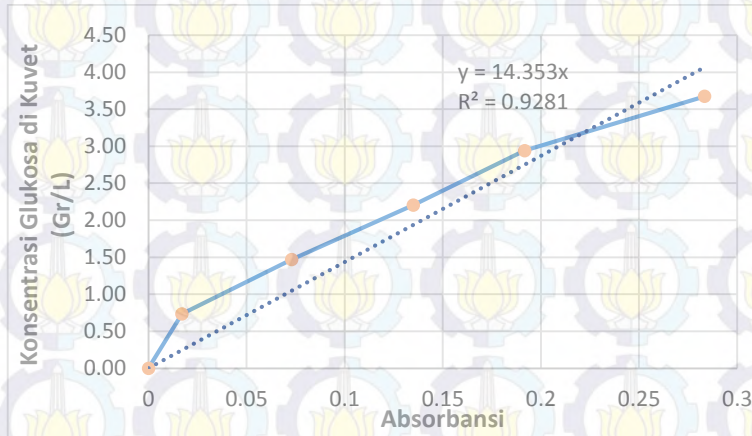
Sebelum melakukan hidrolisis sabut kelapa, tahapan awal yang dilakukan adalah mempersiapkan kurva standar gula reduksi yang nantinya akan digunakan untuk perhitungan konsentrasi gula reduksi. Prosedur pembuatan kurva standar hidrolisis ini sama seperti prosedur pembuatan kurva standar untuk mengukur keaktifan enzim, akan tetapi tidak menggunakan Carboxymetil Cellulose, melainkan menggunakan aquadest. Hal ini dikarenakan konsentrasi yang ingin diukur adalah konsentrasi gula reduksi saja bukan konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan oleh enzim (aktivitas enzim).

Tabel 4.18 Perhitungan Kurva Standar Glukosa untuk Hidrolisis tanpa CMC

Larutan Glukosa 0,024 M (ml)	Buffer (ml)	Diambil (ml)	Aquadest (ml)	V total (ml)	Konsentrasi (gram/l)	Absorbansi
					Di tabung	
0	5	0,2	1,8	5	0	0,000
1	4	0,2	1,8	5	0,735	0,017
2	3	0,2	1,8	5	1,469	0,073
3	2	0,2	1,8	5	2,204	0,135
4	1	0,2	1,8	5	2,939	0,192
5	0	0,2	1,8	5	3,674	0,283

Dari data perhitungan kurva standar glukosa pada tabel 4.18 kemudian diplot grafik dengan data x sebagai absorbansi dan y sebagai konsentrasi glukosa dalam kuvet (gram/l). Setelah itu

dilakukan regresi linier untuk mendapatkan persamaan garis linier. Berikut ini adalah grafik kurva standar glukosa tanpa CMC untuk pengujian gula reduksi hasil hidrolisis



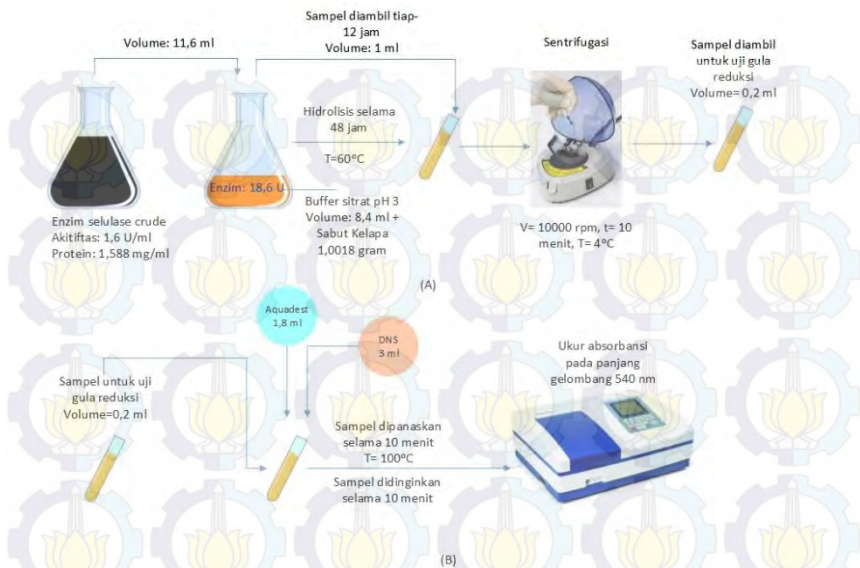
Gambar 4.8 Kurva Standar Glukosa (tanpa CMC)

Dari gambar 4.8 didapatkan persamaan $y = 14,353x$, dimana y adalah konsentrasi glukosa dalam tabung (gram/l) dan x adalah absorbansi, selanjutnya persamaan ini digunakan untuk menghitung konsentrasi gula reduksi yang terbentuk pada proses hidrolisis.

Proses hidrolisis ini dilakukan secara bertahap, yakni hidrolisis pertama yakni hidrolisis dengan variabel *crude* enzim selulase tanpa imobilisasi, *crude* enzim selulase yang kemudian dimurnikan dengan menggunakan *ammonium sulfate*, *crude* enzim selulase yang diimobilisasi dengan membran chitosan, dan *crude* enzim selulase yang diimobilisasi dengan membran chitosan-GDA. Kemudian hidrolisis kedua yakni dengan variabel *crude* enzim selulase yang diimobilisasi dengan membran chitosan dan *crude* enzim selulase yang diimobilisasi dengan membran chitosan-GDA. Hidrolisis kedua ini dilakukan untuk mengetahui retained activity dari *crude* enzim selulase yang digunakan pada hidrolisis pertama.

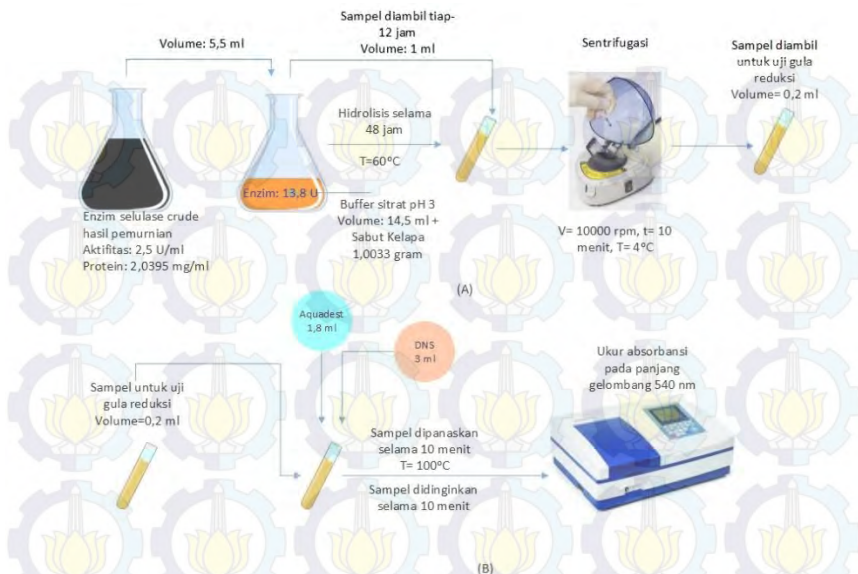
Kondisi operasi dari proses hidrolisis ini adalah pada suhu 60°C dengan pH 3. Kondisi operasi dari proses hidrolisis ini ditetapkan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya bahwa aktivitas enzim akan optimum pada suhu tinggi dengan pH rendah (Anwar dkk., 2011). Proses hidrolisis dilakukan selama 48 jam dengan waktu pengambilan sampel setiap 12 jam, sehingga pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-12, 24, 36, dan ke-48 jam.

Proses hidrolisis pertama diawali dengan mengukur aktivitas *crude* enzim selulase, aktivitas dari *crude* adalah 1,6 U/ml sehingga untuk proses hidrolisis hanya dibutuhkan 11,6 ml karena aktivitas untuk proses hidrolisis adalah 18,6 U/1 gram sabut kelapa. Kemudian ditambahkan buffer sitrat pH 3 kedalam enzim hingga volumenya 20 ml. Penambahan buffer digunakan untuk mengkondisikan proses hidrolisis pada pH 3, karena selulosa dapat terhidrolisis menjadi glukosa dalam jumlah besar pada pH yang rendah (Trajano dan Wyman, 2013). Setelah itu menambahkan 1 gram sabut kelapa kedalam erlenmeyer 250 ml. Setelah tercampur, pH dicek menggunakan kertas pH dan dimasukkan ke dalam *incubator shaker* pada suhu 60°C dengan kecepatan 125 rpm selama 48 jam.



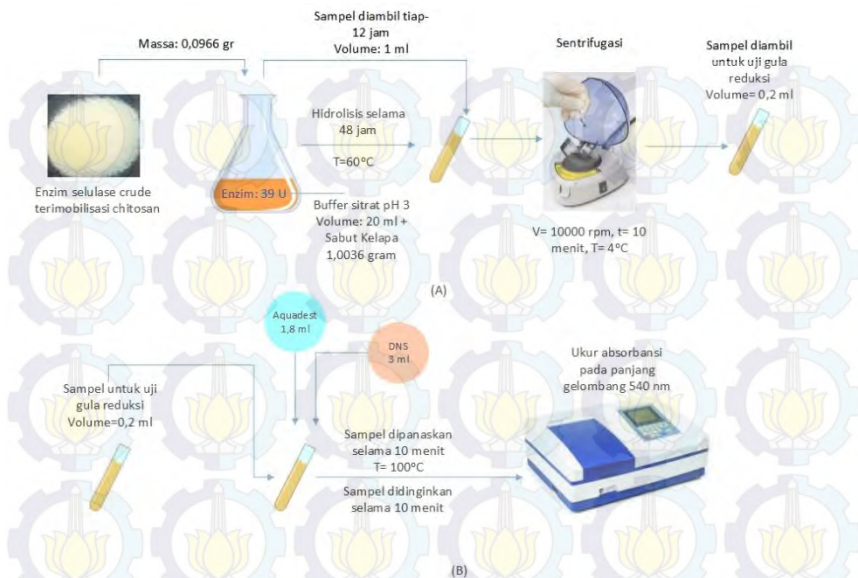
Gambar 4.9 (A) Metodologi Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim *Crude* (B) Metodologi Uji Aktivitas Gula Reduksi Hasil Hidrolisis

Untuk variabel kedua, yakni *crude* enzim selulase yang dimurnikan, karena keterbatasan volume dari enzim maka hanya digunakan 5,5 ml enzim hasil pemurnian dengan aktivitas 2,49 U/ml, sehingga aktivitas totalnya hanya sebesar 13,75 U/ 1 gram sabut kelapa. Perbedaan unit yang digunakan ini tentunya akan mempengaruhi hasil perhitungan nantinya sehingga ditetapkan bahwa hasil gula reduksi akan dihitung per satuan unit.



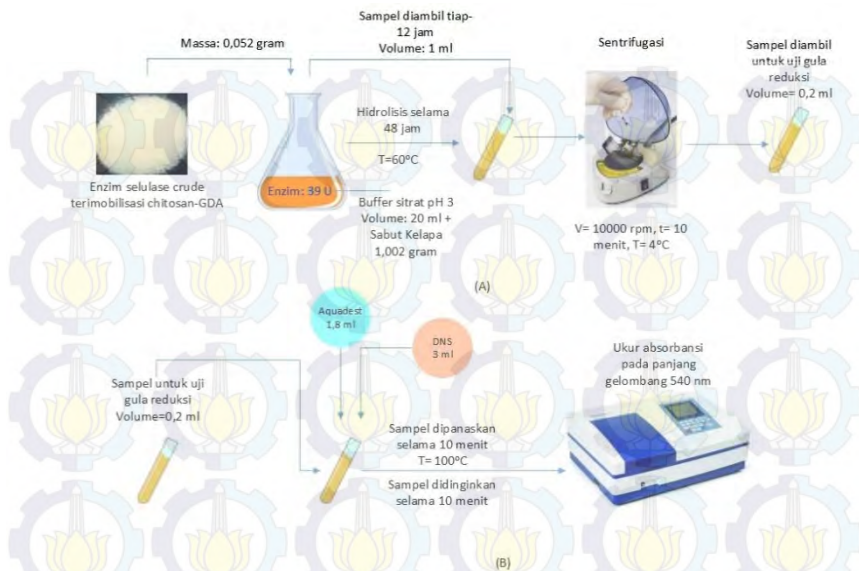
Gambar 4.10 (A) Metodologi Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim Hasil Pemurnian (B) Metodologi Uji Aktivitas Gula Reduksi Hasil Hidrolisis

Kemudian dilakukan juga hidrolisis untuk variabel ketiga dan keempat yakni *crude* enzim selulase hasil imobilisasi dengan membran chitosan, dan *crude* selulase hasil imobilisasi dengan membran chitosan-GDA. Metodologi hidrolisis enzim terimobilisasi ini ditunjukkan pada gambar 4.12 dan 4.13.



Gambar 4.11 (A) Metodologi Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim Hasil Imobilisasi dengan Chitosan (B) Metodologi Uji Aktivitas Gula Reduksi Hasil Hidrolisis

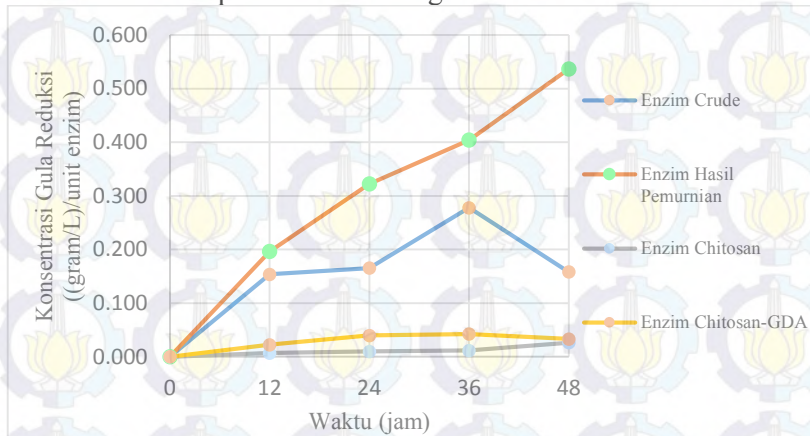
Hasil dari proses imobilisasi ini berupa padatan sehingga tidak dapat dihitung aktivitasnya dan juga karena keterbatasan dari massa padatan enzim sehingga untuk aktivitasnya dapat dilihat dari kemampuan enzim terimobilisasi menghidrolisis selulosa. Massa selulase-chitosan dan selulase-chitosan-GDA yang digunakan adalah 0,097 gram dan 0,052 gram. Kemudian untuk setiap variabel juga ditambahkan buffer sitrat pH 3 hingga 20 ml dan dimasukkan ke dalam *incubator shaker* pada suhu 60°C dengan kecepatan 125 rpm selama 48 jam.



Gambar 4.12 (A) Metodologi Hidrolisis Sabut Kelapa dengan Enzim Hasil Imobilisasi dengan Chitosan-GDA (B) Metodologi Uji Aktivitas Gula Reduksi Hasil Hidrolisis

Analisa konsentrasi gula reduksi dalam hidrolisat dengan metode DNS dilakukan pada setiap sampel pada jam ke-12, 24, 36, dan 48. Untuk mengukur absorbansi pada jam ke-0, digunakan sabut kelapa hasil *pretreatment* yang dicampurkan dengan aquadest, tanpa menambahkan enzim maupun buffer sitrat pH 3. Sampel sebanyak 1 ml diambil dengan menggunakan pipet volume lalu dimasukan ke dalam microtube kemudian ditimbang dengan neraca analitis sehingga memiliki masa gabungan (microtube + larutan + tutup) yang sama antara tube 1 dengan 13 pada *centrifuge* nantinya. Karena proses sentrifugasi dilakukan dengan *centrifuge* kecil maka ketelitian penimbangannya adalah 0,01 gram. Kemudian campuran disentrifugasi selama 10 menit, dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4°C . Proses sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan antara padatan (solid) dari sabut kelapa dengan larutan (*supernatant*) pada hidrolisat. Setelah itu

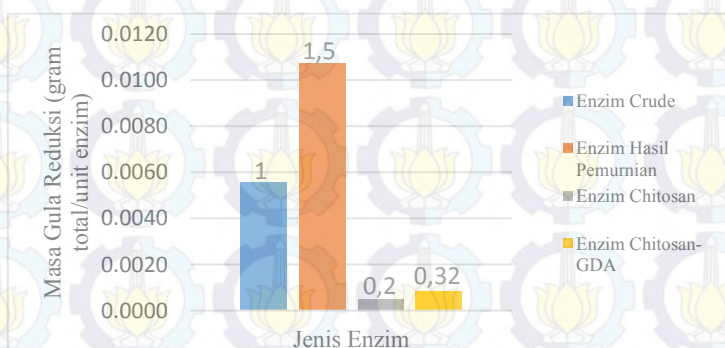
sebanyak 0,2 ml larutan (*supernatant*) dari setiap sampel diambil dengan menggunakan pipet volum kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 1,8 ml dan DNS sebanyak 3 ml kemudian divortex. Prosedurnya sama dengan prosedur uji aktivitas hanya saja CMC digantikan dengan aquadest. Berdasarkan analisa yang telah dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut



Gambar 4.13 Kurva Konsentrasi Gula Reduksi Tiap Variabel *Crude* Enzim pada Hidrolisis Pertama

Gambar 4.13 menunjukkan bahwa konsentrasi gula reduksi mengalami kenaikan pada jam ke 12 untuk semua variabel, kemudian terus menerus meningkat hingga jam ke 36. Akan tetapi enzim *crude* tanpa imobilisasi dan enzim terimobilisasi chitosan-GDA mengalami penurunan setelah jam ke 36, sementara enzim hasil purifikasi dan enzim terimobilisasi chitosan masih mengalami kenaikan bahkan hingga jam ke 48. Peningkatan konsentrasi ini menunjukkan bahwa tiap-tiap variabel enzim selulase mampu menghidrolisis sabut kelapa menjadi gula reduksi. Kurva hasil sampling per-12 jam menunjukkan kecenderungan yang berbeda-beda untuk tiap variabelnya. Kurva seharusnya menunjukkan konsentrasi gula reduksi yang konstan setelah 24 jam. Akan tetapi dari gambar 4.13 dapat dilihat kurva memiliki kecenderungan

untuk turun konsentrasinya setelah jam ke 36. Hal ini disebabkan saat pengambilan sampel, masa gula reduksi yang dihasilkan semakin lama semakin sedikit sehingga hasil optimal hanya didapat pada jam ke 36 sementara setelah jam ke 36 masa gula reduksi yang terdapat pada sampel sudah berkurang dan proses hidrolisis telah berakhir sehingga konsentrasi gula reduksinya menurun. Berbeda halnya dengan enzim hasil pemurnian yang memiliki kecenderungan untuk terus naik bahkan setelah jam ke 48. Hal ini membuktikan bahwa enzim hasil pemurnian mampu menghidrolisis selulosa menjadi gula reduksi dalam jumlah besar bahkan setelah 48 jam enzim masih aktif dan masih mampu menghidrolisis sabut kelapa menjadi gula reduksi. Akan tetapi gula reduksi yang dihasilkan enzim terimobilisasi cenderung sangat kecil apabila dibandingkan dengan *crude* enzim tanpa imobilisasi dan enzim selulase hasil pemurnian. Hal ini terjadi karena pada saat imobilisasi terjadi penurunan aktivitas yang sangat signifikan (Brena dan Batista, 2006). Hal ini juga dapat dilihat pada gambar 4.14 yang menunjukkan perbandingan masa gula reduksi untuk tiap variabel enzim.



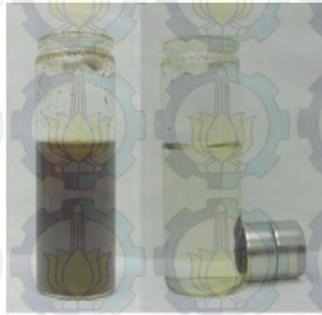
Gambar 4.14 Kurva Perbandingan Masa Total Gula Reduksi Tiap Variabel *Crude* Enzim pada Hidrolisis Pertama

Gambar 4.14 menunjukkan masa glukosa tertinggi yang diraih per unit enzim. Dari gambar 4.14 dapat dilihat bahwa enzim

murni memiliki kemampuan hidrolisis yang sangat besar. Apabila dibandingkan dengan *crude* enzim tanpa imobilisasi, bahkan terdapat perbedaan yang sangat besar. Akan tetapi, enzim selulase yang terimobilisasi chitosan dan enzim selulase yang terimobilisasi chitosan-GDA hanya mampu menghidrolisis selulosa dalam jumlah kecil. Angka diatas bar yakni 1:1,5:0,2:0,32 menunjukan masa gula reduksi yang dihasilkan relative terhadap masa gula reduksi yang dihasilkan enzim *crude*. Berdasarkan hasil ini dapat dilihat bahwa enzim terimobilisasi chitosan hanya menghasilkan gula reduksi 1/5 kali enzim *crude*, begitu juga dengan enzim terimobilisasi chitosan-GDA yang hanya mampu menghasilkan 1/3 kali hasil gula reduksi enzim *crude*. Rendahnya masa gula reduksi yang dihasilkan ini diduga karena beberapa faktor: 1) Kondisi operasi pada saat proses imobilisasi yakni dengan suhu ruang (37°C) sehingga enzim terdenaturasi terlebih dahulu sebelum terimobilisasi sempurna pada chitosan maupun chitosan-GDA karena proses ini dilakukan dalam waktu yang lama yakni 24 jam pada imobilisasi dengan chitosan dan 4 jam pada imobilisasi dengan chitosan-GDA. 2) Substrat yang digunakan pada proses hidrolisis ini berupa padatan, sehingga terdapat ketidaksinkronisasian antara enzim (padat) dengan substrat (padat) sehingga sulit untuk substrat untuk mencapai sisi aktif enzim. 3) Chitosan maupun chitosan-GDA hanya mampu menyerap protein enzim dalam jumlah kecil sehingga hanya sedikit enzim yang dapat terimobilisasi pada matriks chitosan maupun chitosan-GDA.

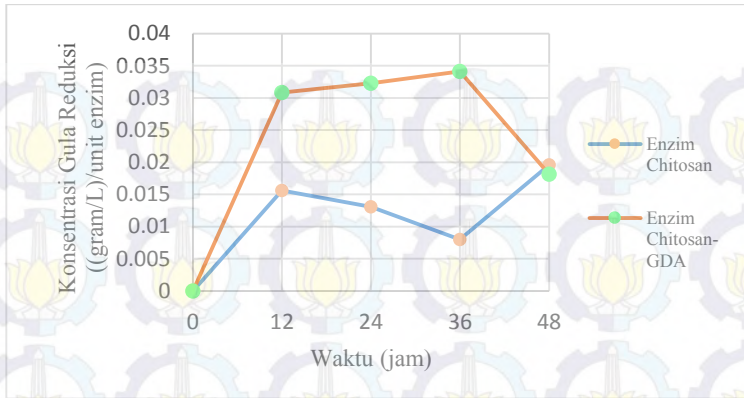
Kemudian dilakukan proses hidrolisis kedua untuk mengetahui *reusability* dari enzim terimobilisasi. Proses hidrolisis kedua diawali dengan mempersiapkan buffer sitrat pH 3 sebanyak 20 ml, menambahkan sabut kelapa hasil pretreatment NaOH 1% sebanyak 1 gram, kemudian menambahkan enzim selulase terimobilisasi chitosan dan terimobilisasi chitosan-GDA yang sebelumnya telah digunakan pada proses hidrolisis pertama. Enzim selulase terimobilisasi yang digunakan ditambahkan bersamaan dengan sisa sabut kelapa pada hidrolisis pertama, hal ini dilakukan karena sulitnya pemisahan antara enzim selulase terimobilisasi

dengan sabut kelapa. Karena setelah proses hidrolisis berlangsung, membran chitosan yang berukuran kecil memiliki warna yang sama dengan sabut kelapa sehingga sulitnya proses pemisahan. Hal ini tentunya bertentangan dengan keuntungan imobilisasi enzim seperti yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya Ghaffar (2010) dan Brena dan Batista (2006). Maka dari itu disarankan untuk penelitian selanjutnya menggunakan partikel magnet seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Pospiskova dan Safarik (2013)



Gambar 4.15 Proses Pemisahan Secara Magnet dari Enzim Chitosan Terimobilisasi dengan Produk Hasil Hidrolisis (Pospiskova dan Safarik, 2013)

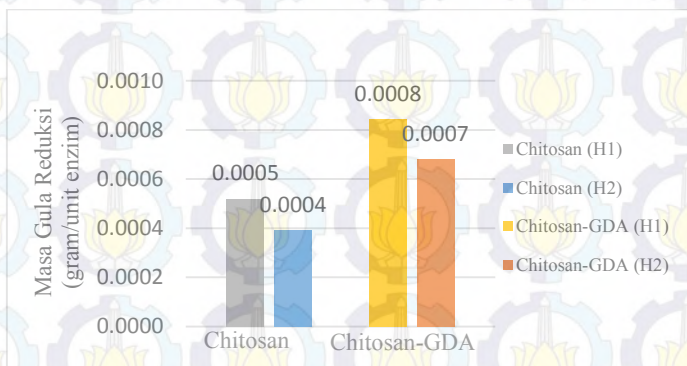
Prosedur dari proses hidrolisis kedua ini sama dengan proses hidrolisis pertama. Berikut adalah hasil dari proses hidrolisis kedua



Gambar 4.16 Kurva Konsentrasi Gula Reduksi Tiap Variabel *Crude Enzim Terimobilisasi pada Hidrolisis Kedua untuk Reusability*

Pada gambar 4.16 dapat dilihat bahwa enzim selulase terimobilisasi chitosan dan chitosan-GDA mampu menghidrolisis sabut kelapa meskipun enzim sebelumnya telah digunakan pada hidrolisis pertama. Enzim selulase terimobilisasi chitosan-GDA memiliki kestabilan yang lebih baik dibandingkan enzim selulase terimobilisasi chitosan. Hal ini terlihat dari jam ke-0 hingga jam ke-36, konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan oleh enzim selulase terimobilisasi chitosan-GDA cenderung naik, sementara setelah 36 jam, konsentrasinya turun. Kecenderungan dari grafik pada gambar 4.16 jauh berbeda antara variabel gula reduksi yang dihasilkan enzim terimobilisasi chitosan dan enzim terimobilisasi chitosan-GDA. Berdasarkan hasil percobaan pada penelitian sebelumnya (Nico dan Ferdian, 2015) seharusnya konsentrasi gula reduksi konstan setelah 24 jam. Konsentrasi gula reduksi turun disebabkan karena volume yang berkurang karena pengambilan sampel sebanyak 1 ml untuk tiap-tiap 12 jam. Sementara pada enzim selulase terimobilisasi chitosan, terlihat bahwa konsentrasi gula reduksi yang tidak stabil, bahkan setelah jam ke-48, konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan masih terus bertambah.

Ketidakstabilan konsentrasi gula reduksi ini disebabkan pada saat pengambilan sampel, konsentrasi gula reduksi yang ada di tiap 1 ml sampel berbeda-beda karena proses pengambilan sampel dilakukan pada saat keadaan *incubator shaker* berhenti sehingga keadaan didalam erlenmeyer tidak homogen.



Gambar 4.17 Kurva Perbandingan Masa Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Pertama dan Kedua untuk *Reusability*

Gambar 4.17 menunjukkan kurva perbandingan masa gula reduksi yang dihasil enzim selulase terimobilisasi chitosan dan enzim terimobilisasikan chitosan-GDA. Enzim terimobilisasi cenderung menurun aktivitas untuk menghidrolisisnya apabila dibandingkan dengan hidrolisis pertama. Untuk itu dilakukan perhitungan *retained activity* dengan cara membandingkan hasil *specific activity* hidrolisis pertama dengan hidrolisis kedua. Berikut hasil perhitungan *specific activity* tiap variabel.

Tabel 4.19 Perhitungan *Specific Activity* pada Hidrolisis Pertama

jenis enzim	unit total	hidrolisis 1					
		gula (gr/unit)	mol (μmol)	waktu (min)	μmol/min	protein (mg)	aktivitas spesifik
A	39,57	0,0005	2,89	2880	0,001	11,84	0,00008
B	39,57	0,0008	4,69	2160	0,002	41,72	0,00005

Tabel 4.20 Perhitungan *Specific Activity* pada Hidrolisis Kedua

jenis enzim	unit total	hidrolisis 2					
		gula (gr/unit)	mol (μmol)	waktu (min)	$\mu\text{mol}/\text{min}$	protein (mg)	aktivitas spesifik
A	39,57	0,0004	2,18	2880	0,0008	11,84	0,00006
B	39,57	0,0006	3,59	2160	0,0017	41,72	0,00004

Keterangan

A : Enzim terimobilisasi chitosan

B : Enzim terimobilisasi chitosan-GDA

Tabel 4.19 dan 4.20 menunjukkan perhitungan *specific activity* dari hidrolisis pertama serta hidrolisis kedua. *Specific activity* adalah μmol glukosa yang terbentuk dibagi lama waktu hidrolisis dan total protein selulase didalam campuran (Ghaffar, 2010). Kemudian dari perhitungan *specific activity* ini, maka dihitunglah *retained activity* dari masing-masing proses. *Retained activity* adalah *specific activity* dari imobilisasi enzim dibagi dengan *specific activity* dari *free enzyme* (Ghaffar, 2010).

Berdasarkan hasil perhitungan maka didapatkan *retained activity* setelah dua kali pengulangan hidrolisis dan didapatkan hasil 75,35% untuk imobilisasi dengan chitosan dan 76,50% untuk imobilisasi dengan chitosan-GDA. *Retained activity* dari hasil hidrolisis dengan chitosan-GDA jauh lebih baik dibandingkan dengan *retained activity* dari hasil hidrolisis dengan chitosan. *Retained activity* ini jauh lebih baik apabila dibandingkan dengan *retained activity* yang dicapai pada percobaan Ghaffar (2010) yakni 46,31% untuk enzim terimobilisasi chitosan dan 50,46% untuk enzim terimobilisasi chitosan-GDA. Perbandingan hasil *retained activity* pada penelitian ini dengan Ghaffar (2010) ditunjukkan pada tabel 4.21. *Retained activity* ini membuktikan bahwa bahkan setelah proses hidrolisis, enzim terimobilisasi dapat

digunakan berulang-ulang kali (*reusability*). Berdasarkan *retained activity* yang didapatkan dari hasil perhitungan maka *retained activity* enzim terimobilisasi chitosan-GDA lebih baik dibandingkan enzim terimobilisasi chitosan-GDA, ini membuktikan bahwa penambahan glutaricdialdehyde menambah kestabilan dari imobilisasi enzim (Storey dan Smith, 1994)

Tabel 4.21 Tabel Perbandingan hasil Protein Aktivitas Reteined Activity

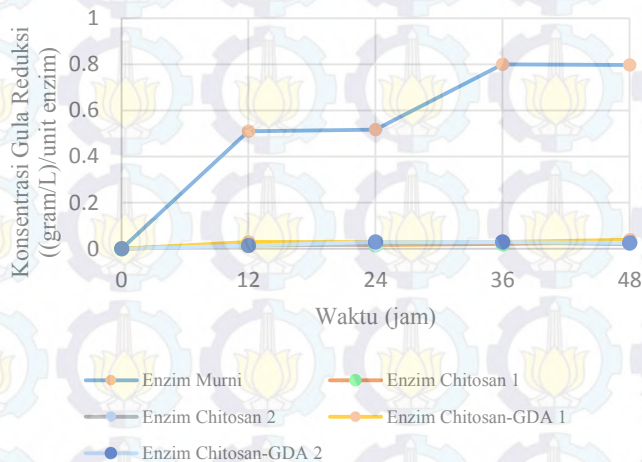
Penelitian	Jenis Enzim	Unit	Protein (mg/0,1 g support)	Aktivitas (U/0,1 g support)	Retained Activity %
Gaffar, 2010 (hidrolisis cmc)	Chitosan	108	0.46	50.01	46.31
	Chitosan-GDA		0.54	58.69	54.34
Gek, Hani 2011 (Hidrolisis Sabut Kelapa)	Chitosan	39.57	0.01184	0,000085	75.35
	Chitosan-GDA		0.04172	0,000052	76.36

Dari tabel 4.21 diketahui bahwa protein dan aktivitas yang dihasilkan dari hidrolisis kami memiliki data yang lebih kecil dari hasil penelitian Ghaffar. Protein pada penelitian ini yang kecil disebabkan karena enzim yang digunakan pada penelitian ini adalah enzim *crude* yang masih mengandung banyak pengotor, sementara pada penelitian oleh Ghaffar (2010) enzim yang digunakan adalah enzim murni. Sehingga unit yang dihasilkan pada enzim murni penelitian Ghaffar (2010) jauh lebih besar dibandingkan dengan unit pada penelitian ini. Begitu juga masa gula reduksi yang dihasilkan.

Kemudian setelah mempertimbangkan faktor hasil gula reduksi yang rendah apabila dibandingkan antara enzim *crude* dengan enzim terimobilisasi, dilakukan proses imobilisasi dengan

enzim murni yang kemudian dihidrolisis kembali dengan sabut kelapa. Prosedur yang dilakukan sama, akan tetapi menggunakan selulase dari *A.Niger* murni. Karena enzim murni selulase dari *A.Niger* dalam bentuk padatan, maka dilakukan pengenceran dengan menggunakan buffer sitrat pH 3. Penggunaan buffer sitrat pH 3 ini untuk mengkondisikan agar enzim memiliki pH 3 yang nantinya sesuai dengan pH untuk proses hidrolisis. Sebelum dilakukan proses imobilisasi, terlebih dahulu dihitung aktivitas dan kadar proteinnya menggunakan uji DNS (Widjaja, 2009) dan uji Bradford (Bradford, 1976). Setelah dilakukan proses imobilisasi kemudian aktivitas serta kadar proteinnya dianalisa kembali.

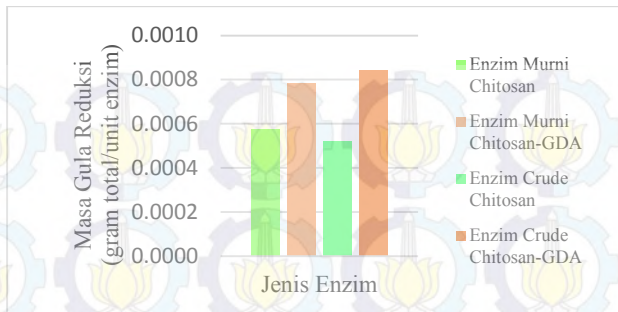
Prosedur pada proses hidrolisis enzim murni terimobilisasi sama dengan prosedur pada hidrolisis enzim *crude* terimobilisasi. Hasil dari proses hidrolisis enzim murni ditunjukkan pada gambar berikut



Gambar 4.18 Kurva Konsentrasi Gula Reduksi Tiap Variabel Enzim Murni pada Hidrolisis dengan Enzim Murni

Berdasarkan gambar 4.18 hasil dari hidrolisis enzim murni terimobilisasi chitosan dan chitosan-GDA sangat kecil yakni 1/11 kali apabila dibandingkan dengan hasil hidrolisis dengan enzim murni. Akan tetapi apabila dibandingkan dengan enzim murni, masa gula reduksi yang dihasilkan lebih stabil sehingga grafik memiliki kecenderungan lebih stabil setelah jam ke 24. Hasil gula reduksi yang dihasilkan oleh enzim terimobilisasi sangat kecil diduga karena kemampuan chitosan mengabsorb protein dari enzim murni. Chitosan mungkin saja mengikat bahan-bahan yang tersuspensi dalam larutan enzim seperti anion polisakarida, protein non enzim dan senyawa pengotor lainnya terlebih dahulu karena memiliki bobot molekul yang lebih rendah, sehingga protein dari enzim selulase tidak mampu diserap secara maksimal (Suhartono, 1991). Selektifitas pengikatan molekul ini memungkinkan matriks chitosan dengan masa yang kecil yakni hanya 0,1 gram akan cepat jenuh oleh bahan-bahan tersuspensi yang berbobot molekul rendah.

Kemudian rendahnya masa gula reduksi yang dihasilkan ini juga diduga karena beberapa faktor: 1) Kondisi operasi pada saat proses imobilisasi yakni dengan suhu ruang (37°C) sehingga enzim terdenaturasi terlebih dahulu sebelum terimobilisasi sempurna pada chitosan maupun chitosan-GDA karena proses ini dilakukan dalam waktu yang lama yakni 24 jam pada imobilisasi dengan chitosan dan 4 jam pada imobilisasi dengan chitosan-GDA. 2) Substrat yang digunakan pada proses hidrolisis ini berupa padatan, sehingga terdapat ketidaksinkronisasian antara enzim (padat) dengan substrat (padat) sehingga sulit untuk substrat untuk mencapai sisi aktif enzim. 3) Chitosan maupun chitosan-GDA hanya mampu menyerap protein enzim dalam jumlah kecil sehingga hanya sedikit enzim yang dapat terimobilisasi pada matriks chitosan maupun chitosan-GDA.

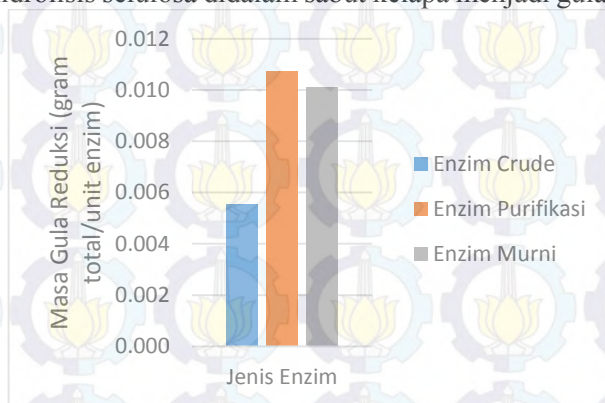


Gambar 4.19 Kurva Perbandingan Masa Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzim *Crude* dan Enzim Murni Terimobilisasi Chitosan dan Chitosan-GDA

Berdasarkan gambar 4.19, terlihat perbedaan hasil gula reduksi total per unit yang tidak signifikan antara hidrolisis dengan enzim *crude* terimobilisasi maupun dengan hidrolisis dari enzim murni terimobilisasi. Enzim murni terimobilisasi chitosan menunjukkan hasil gula reduksi yang lebih baik dibandingkan dengan enzim *crude* terimobilisasi chitosan. Akan tetapi, enzim *crude* terimobilisasi chitosan-GDA menunjukkan hasil gula reduksi yang lebih baik dibandingkan enzim murni terimobilisasi chitosan-GDA. Hal ini menunjukkan bahwa enzim imobilisasi menunjukkan performa hidrolisis yang hampir sama baik itu terimobilisasi dari enzim *crude* maupun enzim murni.

Dari gambar 4.19 juga terlihat bahwa gula reduksi yang dihasilkan enzim terimobilisasi chitosan-GDA jauh lebih besar dibandingkan dengan hasil gula reduksi yang dihasilkan enzim terimobilisasi chitosan. Hal ini sesuai dengan hasil hidrolisis pada penelitian yang dilakukan oleh Ghaffar (2010). Dari hasil ini juga dapat dilihat bahwa proses imobilisasi dengan menggunakan membran chitosan mengalami penurunan aktivitas yang sangat tinggi dibandingkan dengan enzim tanpa imobilisasi (Brena dan Batista, 2006), baik itu enzim *crude* maupun enzim murni. Akan tetapi dengan adanya konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan maka hal ini menunjukkan bahwa selulase baik itu yang berasal dari

crude maupun dari enzim murni mampu terimobilisasi dengan membran chitosan dan membran chitosan-GDA dan mampu menghidrolisis selulosa didalam sabut kelapa menjadi gula reduksi.



Gambar 4.20 Kurva Perbandingan Masa Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzim *Crude*, Enzim Hasil Purifikasi, dan Enzim Murni

Gambar 4.20 menunjukkan kurva perbandingan masa gula reduksi hasil hidrolisis enzim *crude*, enzim hasil purifikasi, dan enzim murni. Berdasarkan hasil gula reduksi yang ditunjukkan, enzim hasil pemurnian memiliki hasil gula reduksi tertinggi apabila dibandingkan dengan enzim murni dan enzim *crude*. Hal ini membuktikan bahwa ammonium sulfat mampu mengendapkan protein dalam jumlah besar (Dennison, 2002). Selanjutnya juga dapat dilihat bahwa hasil gula reduksi yang dihasilkan enzim murni jauh lebih baik dari hasil gula reduksi yang dihasilkan enzim *crude*, hasil ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Ferdian dan Niko (2015) yang membuktikan bahwa enzim murni mampu menghidrolisis selulosa menjadi gula reduksi lebih baik apabila dibandingkan dengan enzim *crude*.

Kemudian dilakukan juga perhitungan yield gula reduksi yakni dengan cara membagi masa gula reduksi yang dihasilkan

dengan masa total selulosa ditambah dengan hemiselulosa. Hasil dari perhitungan yield gula reduksi ditunjukkan pada tabel berikut

Tabel 4.22 Hasil Perhitungan Yield Gula Reduksi per Masa Selulosa+Hemiselulosa

Jenis Enzim Selulase	Massa gula (gram)	Yield*
<i>crude</i>	0,103	0,176
<i>crude</i> hasil pemurnian	0,148	0,251
<i>crude</i> terimobilisasi chitosan	0,021	0,035
<i>crude</i> terimobilisasi chitosan-gda	0,033	0,057
<i>crude</i> terimobilisasi chitosan ¹⁾	0,016	0,026
<i>crude</i> terimobilisasi chitosan-gda ²⁾	0,027	0,046
murni	0,188	0,320
murni terimobilisasi chitosan 1	0,038	0,065
murni terimobilisasi chitosan 2	0,037	0,062
murni terimobilisasi chitosan-gda 1	0,052	0,089
murni terimobilisasi chitosan-gda 2	0,039	0,067

Keterangan:

*) Yield gula reduksi per masa selulosa+hemiselulosa

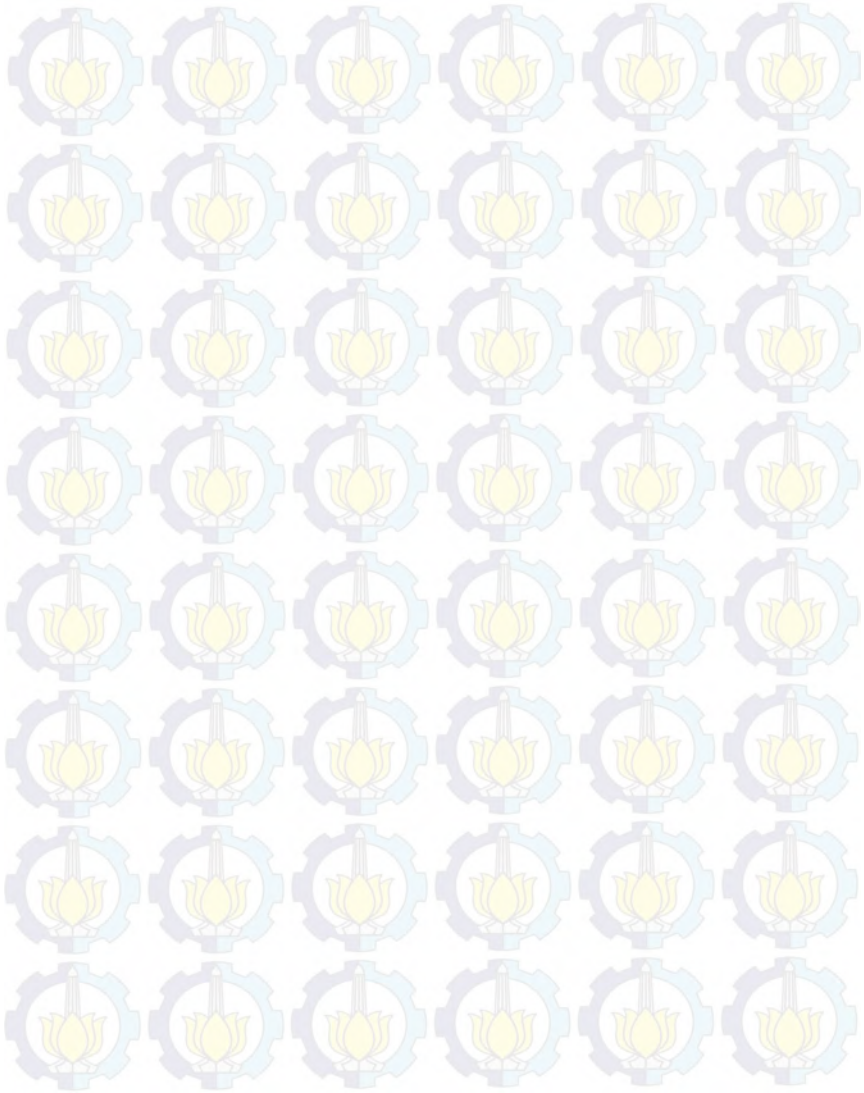
1) Yield enzim terimobilisasi chitosan setelah hidrolisis kedua

2) Yield enzim terimobilisasi chitosan-gda setelah hidrolisis kedua

Berdasarkan tabel 4.22 proses hidrolisis sabut kelapa menggunakan enzim murni memiliki yield gula reduksi terbaik yakni 0,320. Akan tetapi, karena enzim murni tidak menjadi variabel dalam percobaan ini maka diantara variabel yang dihidrolisis, enzim *crude* selulase hasil pemurnian memiliki yield terbesar yakni 0,251. Proses hidrolisis sabut kelapa menggunakan enzim *crude* terimobilisasi chitosan memiliki yield gula reduksi

terendah yakni 0,035 pada run-1 dan 0,026 pada run-2. Nilai yield gula reduksi berbeda-beda pada tiap variabel. Hal ini disebabkan perbedaan unit yang digunakan pada proses hidrolisis. Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Yorgy dan Bergas (2015) hasil yield dari tiap sabut kelapa yang didapat juga berbeda-beda, begitu juga dengan penelitian yang dilakukan oleh Charlin dan Yunus (2014). Lain halnya dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Ferdian dan Nico (2015) hasil yield yang dilaporkan rata-rata sama untuk tiap variabel sabut kelapa. Yield yang sama pada hasil yang dilaporkan oleh Ferdian dan Nico (2015) didapatkan karena jumlah unit dari enzim yang digunakan untuk proses hidrolisis adalah sama yakni 18,6 unit/ 1 gram bagas tebu baik itu menggunakan enzim *crude* maupun enzim murni. Sementara, dengan unit yang berbeda, maka gula reduksi yang dihasilkan juga berbeda-beda bergantung kepada kemampuan tiap enzim untuk menghidrolisis selulosa didalam sabut kelapa.

(Halaman ini sengaja dikosongkan)



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan hasil analisa yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan berupa :

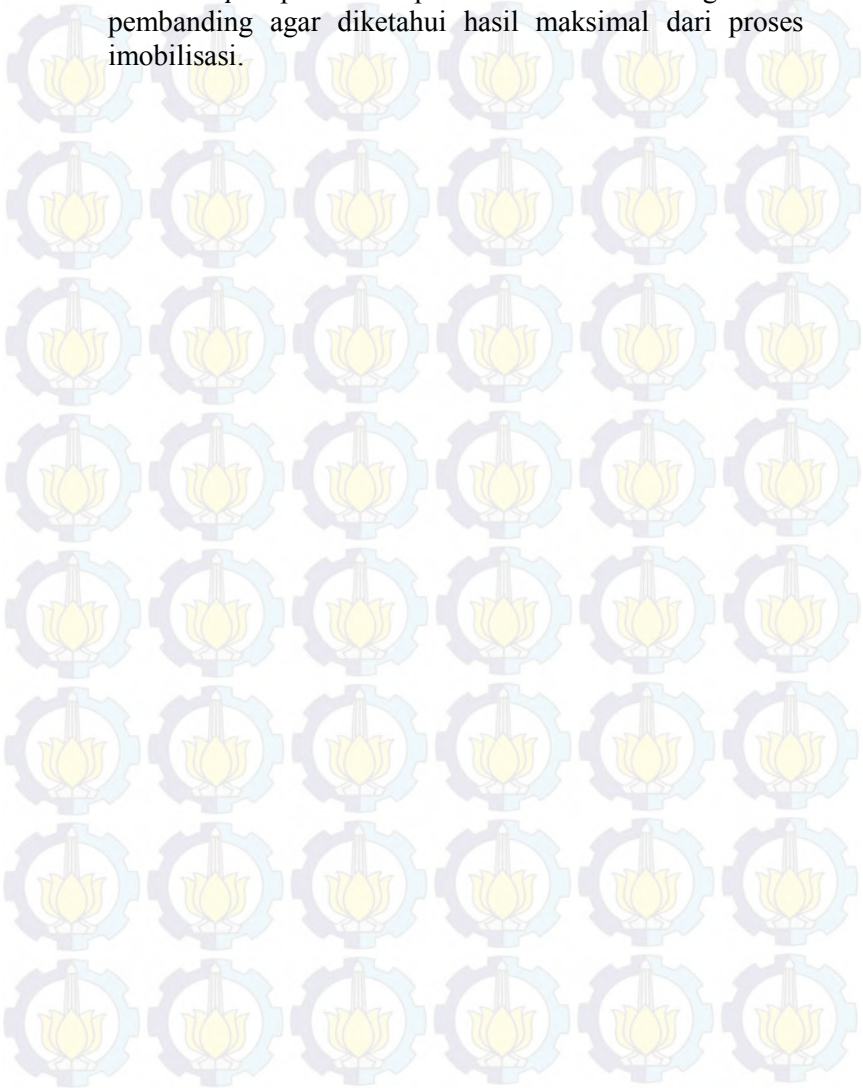
1. Sabut kelapa dapat dikonversi menjadi gula reduksi melalui proses hidrolisis enzimatis menggunakan *crude* enzim selulase dari *Aspergillus niger*.
2. Hidrolisis menggunakan *crude* enzim selulase menghasilkan gula reduksi paling tinggi pada variabel hidrolisis menggunakan *crude* enzim selulase hasil pemurnian yakni sebesar 0,148 gr dengan yield 0,251 gr gula reduksi/gr (selulosa+hemiselulosa) sabut kelapa. Gula reduksi tertinggi kedua dihasilkan oleh hidrolisis *crude* enzim selulase yakni sebesar 0,103 gr dengan yield 0,176 gr gula reduksi/gr (selulosa+hemiselulosa) sabut kelapa. Gula reduksi tertinggi ketiga dihasilkan oleh hidrolisis *crude* enzim selulase terimobilisasi dengan matriks chitosan-GDA yakni sebesar 0,033 gr dengan yield 0,057 gr gula reduksi/gr (selulosa+hemiselulosa) sabut kelapa. Gula reduksi terendah dihasilkan oleh *crude* enzim selulase terimobilisasi dengan matriks chitosan yakni sebesar 0,021 gr dengan yield 0,035 gr gula reduksi/gr (selulosa+hemiselulosa) sabut kelapa.

V.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah

1. Perlu dicari kembali cara yang efektif untuk pemisahan chitosan dan sabut kelapa setelah proses imobilisasi agar hidrolisis kedua dengan matriks yang sama dari hasil imobilisasi didapatkan hasil yang lebih baik (*reusability* baik).
2. Perlu dicari kondisi optimum dalam melakukan imobilisasi enzim agar hasil yang didapatkan lebih baik.,

3. Perlu dipertimbangkan untuk melakukan pengambilan data secara *duplo* pada saat proses imobilisasi sebagai data pembandingan agar diketahui hasil maksimal dari proses imobilisasi.



DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, I.N., Sylviana, S., Lien, H.H., Ismadji, S., Yi-Hsu, J., 2013, "Subcritical Water and Dilute Acid Pretreatments for Bioethanol Production from *Melaleuca leucadendron* Shedding Bark", *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 78, hal. 44-52.
- Anwar, N., Widjaja, A., Winardi, S. 2011, "Study of The Enzymatic Hydrolysis of Alkaline Pretreated Rice Strow Using Cellulase of Various Sources and Compositions", *International Review of Chemical Engineering* Vol. 3.N.2.HAL
- Bailey, J.E., D.F. Ollis. 1986. "Biochemical Engineering Fundamentals", 2nd Ed. McGraw-Hill International Edition, Singapore.
- Bilba, K., Arsene, M-A., and Ouensanga, A..2007, "Study of banana and coconut Wbers Botanical composition, thermal degradation and textural observations", *Bioresource Technology* 98: hal. 58–68.
- Bradford M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Reproduction Research Laboratories*, Department of Biochemistry, University of Georgia, Athens, Georgia 30602 Campbell, R., 2010, "Biologi Edisi 8 Jilid 1 (Terjemahan)", Erlangga, Jakarta.
- Brena, B & Batista, F. 2006. "Immobilization of Enzymes and Cells" Second Edition. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc
- Burgess, Richard. 2009. "Protein Precipitation Techniques". McArdle Lab for Cancer Research, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA

Chen, Ming; Jing Zhao; Liming Xia. 2007. "Enzymatic Hydrolysis of Maize Straw Polysaccharides for The Production of Reducing Sugars" Chemical Engineering and Bioengineering Journal Zhejiang University, Hangzhou 310027, China.

Cheng, Cheanyeh; Kuo-Chung Chang. 2013. "Development of Immobilized Cellulase Through Functionalized Goldnanoparticles for Glucose Production by Continuous Hydrolysis of Waste Bamboo Chopsticks" Chemistry and Research Center for Analysis and Identification Journal Chungli 32023, Taiwan.

Chibata. 1978. "Immobilized Enzymes, Research and Development." Halsted Press, New York

Datta and Rathin, 1981, " Acidogenic Fermentation of Lignocellulose-Acid Yield and Conversion of Components", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 23, Hal. 2167-2170

Dennison, Clive. 2002. "A Guide to Protein Isolation". Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow

Douglas B. Rivers & George H. Emert, 1998, "Factor Affecting The Enzymatic Hydrolysis of Bagasse and Rice Straw", *Biological Waste* 26:58-95, Auburn University Press, Alabama, USA.

Ghaffar, M.A. Abd El-; M.S. Hashem. 2010. "Chitosan and its amino acids condensation adducts as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization" Department of Polymers and Pigments, National Research Center, Tahrir St., Dokki, Giza, Egypt.

Girio, F.M., Fonseca, C, Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Lukasik, R.B. (2010), "Hemicellulose for fuel ethanol: A review", *Bioresource Technology*, Vol. 101, hal. 4775-4800.

Gunam, IB, W., Antara , N.S., 1999. "Study on Sodium Hydroxide Treatment of Corn Stalk to Increase Its Cellulose Saccharification Enzymatically by Using Culture Filtrate of *Trichoderma reesei*". *Gitayana, Agric Technol. J, S* (1) : 34-38

- Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L., dan Howard, S., 2003, "Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 12, hal. 602-619.
- Iranmahboob, J., Nadim, F., Monemi, S., 2002, "Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips", *Biomass and Bioenergy*, Vol. 22, hal. 401-404
- Jia, Ruixiu; Duan, Yunfei, Qiang Fang, Xiangyang Wang, Jianying Huang . 2015. "Pyridine-grafted Chitosan Derivative As An Antifungal Agent" *Journal Food Chemistry Laboratory of Fruits and Vegetables Postharvest and Processing Technology Research of Zhejiang Province, College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, PR China*
- Kementrian Pertanian. 2015. "Renstra Kementrian Pertanian Republik Indonesia Tahun 2015-2019"
- Knorr D. 1982, "Functional properties of chitin and chitosan", *Journal of Food Science* 48:36-41.
- Krajewska B., 2004, "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review", *Enzyme and Microbial Technology*, hal 126–139.
- Kotarzka, K., Swierczynska, A., Dziemianowicz, W., 2014, "Study on the decomposition of lignocellulosic biomass and subjecting it to alcoholic fermentation", *The Journal of Renewable Energy*, Vol. 75, hal. 389-384.
- Kurniawan. Ambriyinto. 2010. "Isolasi dan Karakteristik Bakteri Aerob Pendegradasi Selulosa dari Serasah Daun Rumput (*Pennisetum purpureum* Schaum)" *Laporan Thesis Biologi ITS, Surabaya*
- Ladish, M.R. 1989. "Hydrolysis of Wheat Straw Hemicellulose with Trifluoroacetic Acid". Di dalam *Biomass Handbook*. Kitani, O. and C.W. Hall. Gordon and Breach Science Publisher, New York, p. 435.

- Lehninger AL. 1993. *Dasar-dasar Biokimia Jilid I*. Maggy Thenawijaya. Penerjemah; Jakarta: Erlangga.
- Meddiati, Fajri 2010. "Tepung Ampas Kelapa pada Umur Panen 11-12 Bulan Sebagai Bahan Pangan Sumber Kesehatan" Tesis Universitas Negri Semarang. Hal 4-6.
- Miao Y, Swee NT. 2000. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of peroxidase in chitosan matrix crosslinked with glutaraldehyde. *Analyst* 125:1591-1594
- Milala, M.A., Shugaba, A.A. Gidado, A.C. Ene, J.A. Wafar. 2005. "Studies on the Use of Agricultural Wastes for Cellulase Enzyme production by *Aspergillus niger* Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 325-328.
- Miller, G.L. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Montgomery, J., Fornicola, R.S., 1999, "Convenient Preparation of Amino Acid Derivatives With Two ^{13}C Labels", *Tetrahedron Letters*, Vol. 40, Hal 8337-8341.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapfle, M., Ladisch, M., 2005, "Features Of Promising Technologies For Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass", *Bioresource Technol*, Vol. 96, hal. 673- 686.
- Muljana, H., Tony, H., Lesty, M., Gisca, W., 2013, "Pengaruh Media Sub-dan Superkritik CO_2 Dalam Proses Hidrolisis Enzymatic Terhadap Perolehan Glukosa", Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas Katolik Parahyangan
- Muzzarelli RAA. 1985. *Chitin in The Polysaccharides 3*. Aspinal, editor. Orlando: Academic Press Inc. hlm.147
- Octavia, S., Tatang, H.S., Ronny, P., I.D.G. Arsa P., 2011, "Review: Pengolahan Awal Lignoselulosa Menggunakan Amoniak Untuk Meningkatkan Perolehan Gula Fermentasi", Yogyakarta, ISSN 1693-4393.

- Paskawati, Y.M., Antaresti, Ery, S.R., 2010, “Pemanfaatan Sabut Kelapa Sebagai Bahan Baku Pembuatan Kertas Komposit Alternatif”, Vol. 9(1), hal. 12-21.
- Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P., 2009, “Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation”, *Progress in Polymer Science*, hal 641–678
- Prado, J, dkk., 2014, “Obtaining Sugars from Coconut Husk, Defatted Grape Seed, and Pressed Palm Fiber by Hydrolysis with Subcritical Water”, Elsevier: The Journal of Supercritical Fluids
- Pospiskova. 2013. “Low-cost, Easy-to-prepare Magnetic Chitosan Microparticles for Enzymes Immobilization”. Elsevier: Carbohydrate Polymers Journal
- Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V., 2005, “Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol”, *Biotechnology Progress*, Vol. 21, hal. 816-822.
- Said EG, Muljono J. 1989. Biokonversi. Bogor: Dinas Pendidikan dan Kebudayaan, DIKTI, Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.
- Schlegel Hans G. 1994. “Mikrobiologi Umum”. Penerjemah Tedjo Baskoro. Edisi keenam. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Shafiee, S., Topal, E., 2009, “When will fossil fuel reserves be diminished”, *Energy Policy*, Vol. 37, Hal. 181-189.
- Singh, R., Ashish, S., Sapna, T., Monika, S., 2014, “A Review On Delignification Of Lignocellulosic Biomass For Enhancement Of Ethanol Production Potential”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 32, hal. 713-728.
- Smith JE. 1990. *Prinsip Bioteknologi*. Sumantri B, Subono A, penerjemah;. Jakarta: PT. Gramedia.
- Subramaniyan, S. dan Prema, P., (2002), “Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology”, Molecular biology, Sunggyu, L., Speight, J.G., dan Loyalka, S.K., (2007).

- Sudarsono, Toto R , dll. 2010. “Pembuatan Papan Partikel Berbahan Baku Sabut Kelapa dengan Bahan Pengikat Alami” *Jurnal Teknologi* Vol 3 No 2 Jurusan Teknik mesin
- Suhartono MT . 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- Suhartono. 1991. *Protease*. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor
- Storey, K., Smith, D. 1994. “Immobilization of Polysaccharide-degrading Enzymes” *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*-Vol 12. Hampshire, UK: Intercept Ltd
- Sun, Y., Cheng, J., 2002, “Hydrolysis Of Lignocellulosic Materials For Ethanol Production: A Review”, *Bioresource Technology*, Vol. 83, hal. 1-11.
- Trajano, H. dan Wyman, Charles., 2013, “Fundamentals of Biomass Pretreatment at Low pH”, *Department of Chemical and Environmental Engineering and Center for Environmental Research and Technology, University of California, Riverside, USA*
- Widjaja, Arief. 2009. “Aplikasi Bioteknologi pada Industri Pulp dan Kertas”, itspress, Surabaya.
- Wilda, P.J. de ., Huijgena, W.J.J. Heeres, , H.J. 2011. “Pyrolysis of wheat straw-derived organosolv lignin. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*” 93 95–103
- Woodward, Jonathan. 1989. “Immobilized cellulases for cellulose utilization” *Chemical Technology Division, Oak Ridge National Laborato., P.O. Box 2008, Oak Ridge, TN 37831-6194, U.S.A.* (Received 1 March 1989; accepted 5 May 1989
- Zhao, Y., Lu, W.J., Wang, H.T., Yang, J.L., 2015, Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization *Biosource Technology*, Vol. 100, Hal. 5884-5889

APPENDIKS A

A-1

PERHITUNGAN KADAR SELULOSA, HEMISELULOSA, DAN LIGNIN PADA SABUT KELAPA MENGGUNAKAN METODE DATTA & RATHIN

Tabel A.1.1 Data Massa Pada berbagai Tahapan Metode Datta

Variabel	Massa (gr)				
	a	b	c	d	e
Untreated	1,003	0,915	0,728	0,508	0,022
Pretreatment NaOH 1%	1,008	0,765	0,469	0,174	0,003

A.1.1 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Sabut Kelapa Sebelum *Pretreatment*

1. Perhitungan Kadar Selulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,7282-0,5083)/1,0031 \times 100\% \\ &= 21,92\%\end{aligned}$$

2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,9151-0,7282)/1,0031 \times 100\% \\ &= 18,63\%\end{aligned}$$

3. Perhitungan Kadar Lignin

$$\begin{aligned}\text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\ &= (0,5083-0,0225)/1,0031 \times 100\% \\ &= 48,42\%\end{aligned}$$

A.1.2 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Sabut Kelapa Setelah *Pretreatment* NaOH 1%

1. Perhitungan Kadar Selulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,4690-0,1744)/1,008 \times 100\% \\ &= 29,22\%\end{aligned}$$

2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,7657-0,4690)/1,008 \times 100\% \\ &= 29,43\%\end{aligned}$$

3. Perhitungan Kadar Lignin

$$\begin{aligned}\text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\ &= (0,1744-0,003)/1,008 \times 100\% \\ &= 17,00 \%\end{aligned}$$

Hasil perhitungan kadar selulosa, hemiselulosa, dan lignin sabut kelapa pada berbagai variabel ditampilkan pada tabel berikut.

Tabel A.1.2 Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Sabut Kelapa Sebelum dan Setelah Pretreatment

Variabel	Kadar (%)		
	Selulosa	Hemiselulosa	Lignin
Untreated	21,92	18,63	48,42
Pretreatment NaOH 1%	29,23	29,43	17,00

A-2

PERHITUNGAN KURVA STANDAR GLUKOSA UNTUK MENGUKUR AKTIVITAS ENZIM

A.1 Perhitungan Kurva Standar Glukosa

$$\text{Massa glukosa} = 0,3735 \text{ gram}$$

$$\text{Volume buffer sitrat pH 5,5} = 100 \text{ ml}$$

$$\text{BM glukosa} = 180 \text{ gram/mol}$$

$$\begin{aligned}\text{Mol glukosa} &= \text{massa glukosa/BM} \\ &= 0,3735 \text{ gram} / 180 \text{ gr/mol} \\ &= 0,002 \text{ mol} \\ &= 2075 \text{ } \mu\text{mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi glukosa awal} &= \text{mol glukosa/ volume buffer sitrat pH 5,5} \\ &= 2075 \text{ } \mu\text{mol}/100 \text{ ml} \\ &= 20,75 \text{ } \mu\text{mol/ml}\end{aligned}$$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

$$\begin{aligned}
 &\text{Konsentrasi di tabung reaksi} \\
 &= \frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}} \\
 &= \frac{20,75 \mu\text{mol/ml} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \\
 &= 4,15 \mu\text{mol/ml}
 \end{aligned}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Berikut adalah hasil kurva standar glukosa.

Tabel A.2.1 Data Konsentrasi dan Absorbansi Glukosa pada Kurva Standar Glukosa untuk Mengukur Aktifitas Enzim

Buffer (ml)	Diambil (ml)	CMC (ml)	V total (ml)	Konsentrasi (gram/L)	Absorbansi
5	0.2	1.8	5	0	0.000
4	0.2	1.8	5	4.15	0.036
3	0.2	1.8	5	8.3	0.106
2	0.2	1.8	5	12.45	0.151
1	0.2	1.8	5	16.6	0.235
0	0.2	1.8	5	20.75	0.304

Setelah diplot antara konsentrasi gula reduksi vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapatkan persamaan $y = 71,694 x$ dengan y sebagai konsentrasi glukosa ($\mu\text{mol/ml}$) dan x sebagai absorbansi.

A-3

PERHITUNGAN ENZIM

A.3.1 Perhitungan Aktivitas *Crude Enzyme* Selulase dari *A.niger* dengan Substrat Jerami Padi

1. Pengukuran aktivitas enzim selulase

$$\text{Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1)} = 0,229$$

$$\text{Absorbansi larutan koreksi (A2)} = 0,006$$

$$\text{Absorbansi larutan setelah koreksi (A)} = A1 - A2$$

$$= 0,223$$

2. Konsentrasi glukosa

= A x slope kurva standar glukosa

$$= 0,223 \times 71,694$$

$$= 16,03 \mu\text{mol/ml}$$

3. Aktivitas enzim selulase (U/ml)

= mol glukosa/waktu inkubasi

$$= 15,98 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit}$$

$$= 1,603 \text{ U/ volume enzim}$$

4. Perhitungan Kebutuhan *Crude Enzyme* Selulase dari *A.niger*

Kebutuhan enzim = 18,6 U/1 gr sabut kelapa

Kebutuhan enzim selulase

$$= \frac{\text{kebutuhan enzim}}{\text{aktivitas enzim}}$$

$$= \frac{18,6 \text{ U}}{1,603 \text{ U/ml}}$$

$$= 11,58 \text{ ml}$$

A.3.2 Perhitungan Pemurnian *Crude Enzyme* Selulase dari *A.niger* dengan *Ammonium Sulfate*

1. Perhitungan dengan penentuan kejenuhan 80% pada suhu 4°C

$$\text{Massa ammonium sulfate} = \frac{519.1(S_2 - S_1)}{100 - (0.3S_2)} \times \frac{V_{\text{selulase}}(\text{mL})}{1000 (\text{mL})}$$

Dengan volum awal selulase 400 ml sehingga,

$$\text{Massa ammonium sulfate} = \frac{519.1(80 - 0)}{100 - (0.3(80))} \times \frac{400 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}$$

$$\text{Massa ammonium sulfate} = 218,6 \text{ gram}$$

2. Perhitungan untuk pelarutan endapan Ammonium Sulfate

dengan buffer asetat 0,02 M pH 5,5

Untuk perhitungan pelarutan, dilakukan dengan perbandingan 1:70 antara volume buffer dengan ekstrak kasar

$$\text{Volum buffer} = \frac{1}{70} \times 400 \text{ ml}$$

$$\text{Volum buffer} = 5,7 \text{ ml}$$

A.3.3. Perhitungan Aktivitas *Crude Enzyme* Selulase dari *A.niger* hasil pemurnian

1. Pengukuran aktivitas enzim selulase

$$\begin{aligned}\text{Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1)} &= 1,286 \\ \text{Absorbansi larutan koreksi (A2)} &= 0,937 \\ \text{Absorbansi larutan setelah koreksi (A)} &= A1 - A2 \\ &= 0,349\end{aligned}$$

2. Konsentrasi glukosa

$$\begin{aligned}&= A \times \text{slope kurva standar glukosa} \\ &= 0,349 \times 71,694 \\ &= 24,950 \mu\text{mol/ml}\end{aligned}$$

3. Aktivitas enzim selulase (U/ml)

$$\begin{aligned}&= \text{mol glukosa/waktu inkubasi} \\ &= 24,950 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit} \\ &= 2,4975 \text{ U/ml}\end{aligned}$$

A.3.4. Perhitungan Aktivitas *Enzyme Murni* Selulase dari *A.niger*

1. Pengukuran aktivitas enzim selulase

$$\begin{aligned}\text{Absorbansi larutan sebelum koreksi (A1)} &= 0,753 \\ \text{Absorbansi larutan koreksi (A2)} &= 0,287 \\ \text{Absorbansi larutan setelah koreksi (A)} &= A1 - A2 \\ &= 0,466\end{aligned}$$

2. Konsentrasi glukosa

$$\begin{aligned}&= A \times \text{slope kurva standar glukosa} \\ &= 0,466 \times 71,694 \\ &= 33,409 \mu\text{mol/ml}\end{aligned}$$

3. Aktivitas enzim selulase (U/ml)

$$\begin{aligned}&= \text{mol glukosa/waktu inkubasi} \\ &= 33,409 \mu\text{mol} / 10 \text{ menit} \\ &= 3,34 \text{ U/ml}\end{aligned}$$

A-4

PERHITUNGAN BRADFORD (PENGUKURAN KADAR PROTEIN)

A.4.1. Perhitungan Kurva Standar Bradford

1. Membuat larutan standar bovine serum albumin (BSA)

$$\text{Massa BSA} = 0,1 \text{ gram}$$

Volume aquades = 100 ml
 Konsentrasi BSA = massa BSA / volume aquades
 = 0,1 gram / 100 ml
 = 100 mg / 100 ml
 = 1 mg/ml

2. Membuat larutan NaCl 0,15 M

BM NaCl = 58,44 gram/mol
 Massa NaCl = 5,844 gram
 Volum aquades = 666 ml
 Konsentrasi NaCl = mol NaCl/ Volum pelarut
 = (Massa NaCl/BM NaCl) / (Volum Pelarut (ml)/1000 ml)
 = (5,844 gram/58,44 gram/mol) / (666 ml/1000 ml)
 = 0,15 M

Kemudian dari tiap-tiap BSA diencerkan dengan konsentrasi 0,1;0,2;0,3;0,5;1. Hasil perhitungannya ditunjukkan pada tabel A.4.1 berikut

Tabel A.4.1 Data Konsentrasi dan Absorbansi Protein dengan BSA pada Kurva Standar Bradford untuk Mengukur Kadar Protein Enzim

	Volum BSA (ml)	Volum NaCl (ml)	Volum Dye Reagent (ml)	Konsentrasi	Absorbansi
Blanko	0	0,1	5	0	0
1	0,01	0,09	5	0,1	0,099
2	0,02	0,08	5	0,2	0,141
3	0,03	0,07	5	0,3	0,262
4	0,05	0,05	5	0,5	0,501
5	0,1	0	5	1	0,655

Kemudian diplot antara konsentrasi BSA dengan absorbansinya untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapatkan

persamaan $y = 1,3133x$ dengan y sebagai konsentrasi protein (mg/ml) dan x sebagai absorbansi

A.4.2. Perhitungan kadar protein *Crude Enzyme* Selulase dari *A.niger* sebelum Imobilisasi

1. Konsentrasi protein
= $A \times \text{slope kurva standar protein (BSA)}$
= $0,222 \times 1,3133$
= $0,292 \text{ mg}$
2. Konsentrasi protein per ml *Crude Enzyme* Selulase
= $\text{Konsentrasi protein/volum enzim (ml)}$
= $0,292 \text{ mg}/0,05 \text{ ml}$
= $5,840 \text{ mg/ml}$
3. Kadar protein total *Crude Enzyme* Selulase
= $\text{Konsentrasi protein} \times \text{volume enzim total sebelum imobilisasi (ml)}$
= $3,270 \text{ mg/ml} \times 32,2 \text{ ml}$
= $188,042 \text{ mg}$

A.4.3. Perhitungan kadar protein *Crude Enzyme* Selulase dari *A.niger* setelah Imobilisasi

Diambil sampel kadar protein selulase dalam supernatant setelah imobilisasi dengan Chitosan-GDA

1. Konsentrasi protein
= $A \times \text{slope kurva standar protein (BSA)}$
= $0,173 \times 1,3133$
= $0,227 \text{ mg}$
2. Konsentrasi protein per ml *Crude Enzyme* Selulase
= $\text{Konsentrasi protein/volum enzim (ml)}$
= $0,127 \text{ mg}/0,05 \text{ ml}$
= $4,544 \text{ mg/ml}$
3. Kadar protein total supernatant *Crude Enzyme* Selulase
= $\text{Konsentrasi protein} \times \text{volum enzim total sebelum imobilisasi (ml)}$
= $4,544 \text{ mg/ml} \times 32,2 \text{ ml}$
= $146,317 \text{ mg}$
4. Total protein yang terserap pada membran Chitosan-GDA
= $\text{Kadar protein sebelum imobilisasi} - \text{kadar protein dalam supernatan}$
= $188,042 \text{ mg} - 146,317 \text{ mg}$

= 41,724 mg

Untuk perhitungan kadar protein untuk variable lainnya, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama.

A-5 PERHITUNGAN HIDROLISIS

A.5.1. Perhitungan Kurva Standar Gula Reduksi

Massa glukosa = 0,3674 gram
Volume buffer sitrat pH 3 = 100 ml

Konsentrasi glukosa awal
= massa glukosa/ volume buffer sitrat pH 3
= 0,3674 gram/100 ml
= 0,0036 gram/ml
= 3,674 gram/L

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi
= $\frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$
= $\frac{3,674 \text{ gram/L} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$
= 3,735 gram/L

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi gula reduksi vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan $y = 14,353 x$ dengan y sebagai konsentrasi gula reduksi (gram/L) dan x sebagai absorbansi.

A.5.2 Perhitungan Konsentrasi, Massa, Perbandingan Gula Reduksi, dan Yield Gula Reduksi

1. Perhitungan konsentrasi gula reduksi dari hidrolisis *crude enzyme* selulase

Diambil salah satu data absorbansi hidrolisis *crude enzyme* selulase sample pada jam ke-36

Absorbansi = 0,360

$$\text{Absorbansi (y)} = 14,353 \times$$

$$\text{Konsentrasi gula reduksi (x)} = (0,360 \times 14,353) \\ = 0,517$$

2. Perhitungan massa gula reduksi dari hidrolisis *crude enzyme* selulase
Diambil salah satu data absorbansi hidrolisis *crude enzyme* selulase sample pada jam ke-36

$$\text{Konsentrasi gula} = 0,517 \text{ gram/L}$$

$$\text{Volume larutan hidrolisis} = 20 \text{ ml}$$

$$\text{Massa gula reduksi} = \text{konsentrasi gula} \times \text{volume larutan} \\ = 0,517 \text{ gram/L} \times (20/1000) \text{ L} \\ = 0,0103 \text{ gr}$$

Perhitungan massa gula reduksi variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

3. Perhitungan massa gula reduksi per unit *crude enzyme* selulase
Diambil salah satu data absorbansi hidrolisis *crude enzyme* selulase sample pada jam ke-36

$$\text{Massa gula reduksi total} = 0,103 \text{ gram}$$

$$\text{Unit untuk hidrolisis} = 18,6 \text{ unit}$$

$$\text{Massa gula reduksi} = \text{massa gula reduksi total/unit} \\ \text{hidrolisis} \\ = 0,103 \text{ gram} / 18,6 \text{ unit} \\ = 0,0056 \text{ gram gula reduksi/unit}$$

4. Perhitungan konsentrasi gula reduksi dari hidrolisis *crude enzyme* selulase terimobilisasi

Diambil salah satu data absorbansi hidrolisis *crude enzyme* selulase terimobilisasi chitosan-GDA sample pada jam ke-36

$$\text{Absorbansi} = 0,116$$

$$\text{Absorbansi (y)} = 14,353 \times$$

$$\text{Konsentrasi gula reduksi (x)} = (0,116 \times 14,353) \\ = 1,670 \text{ gram/L}$$

5. Perhitungan massa gula reduksi dari hidrolisis *crude enzyme* selulase terimobilisasi

Diambil salah satu data absorbansi hidrolisis *crude enzyme* selulase terimobilisasi chitosan-GDA sample pada jam ke-36

$$\text{Konsentrasi gula} = 1,670 \text{ gram/L}$$

Volume larutan hidrolisis = 20 ml
 Massa gula reduksi = konsentrasi gula x volume larutan
 = 1,670 gram/L x (20/1000) L
 = 0,033 gram

6. Perhitungan massa gula reduksi per unit *enzyme* terimobilisasi

Diambil salah satu data absorbansi hidrolisis *crude enzyme* selulase terimobilisasi chitosan-GDA sample pada jam ke-36

Massa gula reduksi total = 0,033 gram
 Unit untuk hidrolisis = 39,574 unit
 Massa gula reduksi = massa gula reduksi total/unit hidrolisis
 = 0,033gram x 39,574 unit
 = 0,042 gram gula reduksi/unit

7. Perbandingan gula reduksi terimobilisasi dengan gula reduksi dari *free enzyme* selulase

Massa gula reduksi terimobilisasi = 0,042 gram gula reduksi/unit

Massa gula reduksi *free enzyme* = 0,0056 gram gula reduksi/unit

$$\begin{aligned} \text{Perbandingan gula reduksi} &= \frac{\text{Massa gula reduksi terimobilisasi}}{\text{Massa gula reduksi free enzyme}} \\ &= \frac{0,042 \text{ gram gula reduksi terimobilisasi}}{0,0056 \text{ gram gula reduksi free enzyme}} \\ &= 7,5 \frac{\text{gram gula reduksi terimobilisasi}}{\text{gram gula reduksi free enzyme}} \end{aligned}$$

Perhitungan perbandingan massa gula reduksi variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

8. Perhitungan yield gula reduksi

Diambil salah satu data absorbansi hidrolisis enzim hasil pemurnian pada jam ke-48

Massa gula reduksi = 0,148 gram

Massa sabut kelapa yang dihidrolisis = 1,0033 gram

Yield gula reduksi

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{massa gula reduksi}}{\%(\text{hemiselulosa} + \text{selulosa}) \times \text{massa sabut kelapa}} \\ &= \frac{0,148 \text{ gram}}{(29,23 + 29,43)\% \times 1,0033 \text{ gram}} \\ &= 0,251 \frac{\text{gr gula reduksi}}{\text{gr (selulosa + hemiselulosa) sabut kelapa}} \end{aligned}$$

Untuk perhitungan yield variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama

$$\text{Yield gula reduksi} = \frac{\text{massa gula reduksi}}{\%(\text{hemiselulosa} + \text{selulosa}) \times \text{massa sabut kelapa}}$$

A-6

PERHITUNGAN RETAINED ACTIVITY

A.6.1 Perhitungan konsentrasi gula reduksi total per unit enzim

Karena unit yang digunakan dalam proses hidrolisis berbeda-beda maka untuk membandingkan aktifitasnya digunakan konsentrasi gula reduksi per satuan unit

1. Enzim crude selulase terimobilisasi chitosan

Diambil sampel konsentasi gula reduksi yang dihasilkan crude selulase pada jam ke-48 pada hidrolisis run-1

Konsentrasi gula reduksi = 0,021 gram

Unit enzim = 39,574 U

Konsentrasi gula reduksi = 0,056 gram/39,574 U

= 0,00051 gram/U

2. Enzim crude selulase terimobilisasi Chitosan-GDA

Diambil sampel konsentasi gula reduksi yang dihasilkan crude selulase pada jam ke-36 pada hidrolisis run-1

Konsentrasi gula reduksi = 0,033 gram

Unit enzim = 39,574 U

Konsentrasi gula reduksi = 0,033 gram/39,574 U

= 0,000843 gram/U

A.6.2 Perhitungan *specific activity* enzim

1. Enzim crude selulase terimobilisasi chitosan

Konsentrasi gula reduksi = 0,00051 gram

Mol gula reduksi = 0,00051 gram/BM glukosa
= 0,00051 gram/ 180 gram/mol
= $2,8881 \times 10^{-6}$ mol
= 2,8881 μ mol

Waktu hidrolisis = 48 jam
= 2880 min

Total protein dalam enzim = 11,84 mg

Specific activity =
$$\frac{\text{mol gula reduksi}}{\text{waktu hidrolisis} \times \text{protein}}$$

=
$$\frac{2,8881 \mu\text{mol}}{2880 \text{ min} \times 11,84 \text{ mg}}$$

= 0,00085 μ mol/min.mg

2. Enzim crude selulase terimobilisasi chitosan-GDA

1. Enzim crude selulase terimobilisasi chitosan

Konsentrasi gula reduksi = 0,00084 gram

Mol gula reduksi = 0,00084 gram/BM glukosa
= 0,00084 gram/ 180 gram/mol
= $4,6881 \times 10^{-6}$ mol
= 4,6881 μ mol

Waktu hidrolisis = 36 jam
= 2160 min

Total protein dalam enzim = 41,72 mg

Specific activity =
$$\frac{\text{mol gula reduksi}}{\text{waktu hidrolisis} \times \text{protein}}$$

=
$$\frac{4,6681 \mu\text{mol}}{2160 \text{ min} \times 41,72 \text{ mg}}$$

= 0,00052 μ mol/min.mg

Perhitungan yang sama dilakukan pada enzim terimobilisasi chitosan dan chitosan-GDA pada hidrolisis kedua dan didapatkan *specific activity* 0,000064 μ mol/min.mg dan 0,000040 μ mol/min.mg.

A.6.3 Perhitungan *retained activity* enzim

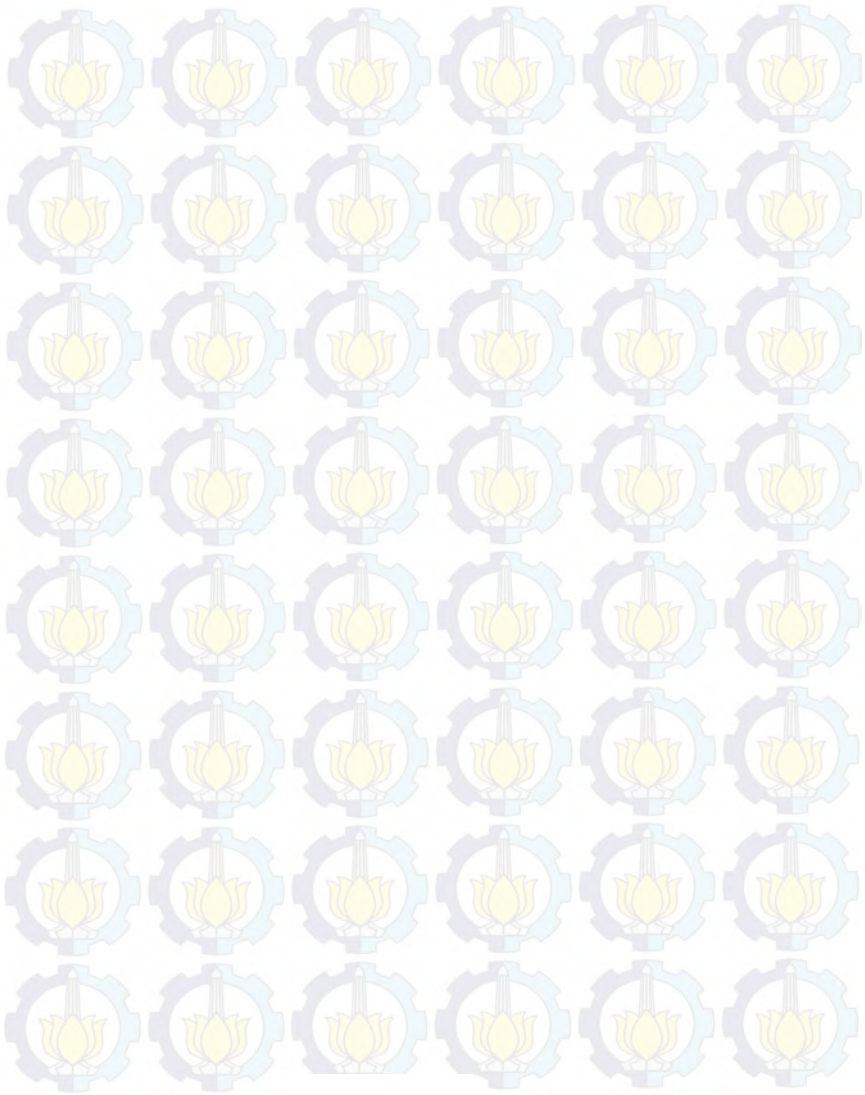
1. Enzim selulase terimobilisasi chitosan

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{specific activity enzim terimob hidrolisis 2}}{\text{specific activity enzim terimob hidrolisis 1}} \times 100\% \\ &= (0,00085/0,000064) \times 100\% \\ &= 75,35\% \end{aligned}$$

2. Enzim selulase terimobilisasi chitosan-GDA

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{specific activity enzim terimob hidrolisis 2}}{\text{specific activity enzim terimob hidrolisis 1}} \times 100\% \\ &= (0,00052/0,000040) \times 100\% \\ &= 76,50\% \end{aligned}$$

(Halaman ini sengaja dikongkan)



A-7
PERHITUNGAN DATTA DAN RATHIN

	Berat					% Kadar					
Sample Hasil Pretreatment	a	b	c	d	e	Selulosa	Hemi-selulosa	Lignin	Ekstrak	Abu	Total
Unpretreatment	1,001	0,915	0,728	0,508	0,022	21,97%	18,67%	48,53%	8,58%	2,25%	100%
NaOH 1% 16 Hour	1,008	0,765	0,469	0,174	0,003	29,23%	29,43%	17,00%	24,04%	0,30%	100%

A-8
PERHITUNGAN HIDROLISIS DENGAN CRUDE ENZIM

A.8.1 Hidrolisis Run-1

Jam	Hidrolisis Enzim Crude							
	A1	A2	A3	A	Konsentrasi	Konsentrasi Gula/unit	Massa Gula	Yield
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,200	0,198	0,199	0,199	2,856	0,154	0,057	0,097
24	0,214	0,213	0,215	0,214	3,072	0,165	0,061	0,105
36	0,360	0,360	0,360	0,360	5,167	0,278	0,103	0,176
48	0,205	0,205	0,205	0,205	2,942	0,158	0,059	0,100

Jam	Hidrolisis Enzim Crude Hasil Purifikasi							
	A1	A2	A3	A	Konsentrasi	Konsentrasi gula/unit	Massa Gula	Yield
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,189	0,188	0,187	0,188	2,698	0,196	0,054	0,092
24	0,309	0,309	0,308	0,309	4,430	0,322	0,089	0,151
36	0,387	0,387	0,387	0,387	5,555	0,404	0,111	0,189
48	0,514	0,515	0,513	0,514	7,377	0,537	0,148	0,251

Jam	Hidrolisis Enzim Crude Terimobilisasi Chitosan							
	A1	A2	A3	A	Konsentrasi	Konsentrasi gula/unit	Massa Gula	Yield
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,019	0,018	0,019	0,019	0,268	0,007	0,005	0,009
24	0,027	0,027	0,027	0,027	0,388	0,010	0,008	0,013
36	0,033	0,032	0,031	0,032	0,459	0,012	0,009	0,016
48	0,075	0,070	0,070	0,072	1,029	0,026	0,021	0,035

Jam	Hidrolisis Enzim Crude Terimobilisasi Chitosan-GDA							
	A1	A2	A3	A	Konsentrasi	Konsentrasi gula/unit	Massa gula	Yield
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,061	0,062	0,062	0,062	0,885	0,022	0,018	0,030
24	0,109	0,109	0,108	0,109	1,560	0,039	0,031	0,053
36	0,116	0,117	0,116	0,116	1,670	0,042	0,033	0,057
48	0,091	0,091	0,091	0,091	1,306	0,033	0,026	0,044

A.8.2 Hidrolisis Run-2

Jam	Hidrolisis Enzim Crude Terimobilisasi Chitosan							
	A1	A2	A3	A	Konsentrasi	Konsentrasi gula/unit	Massa Gula	Yield
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,043	0,043	0,043	0,043	0,617	0,016	0,012	0,021
24	0,036	0,036	0,036	0,036	0,517	0,013	0,010	0,018
36	0,022	0,022	0,022	0,022	0,316	0,008	0,006	0,011
48	0,054	0,054	0,054	0,054	0,775	0,020	0,016	0,026

Jam	Hidrolisis Enzim Crude Terimobilisasi Chitosan-Gda							
	A1	A2	A3	A	Konsentrasi	Konsentrasi gula/unit	Massa Gula	Yield
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,085	0,085	0,085	0,085	1,220	0,031	0,024	0,042
24	0,089	0,089	0,089	0,089	1,277	0,032	0,026	0,044
36	0,094	0,094	0,094	0,094	1,349	0,034	0,027	0,046
48	0,050	0,050	0,050	0,050	0,718	0,018	0,014	0,024

A-9

PERHITUNGAN HIDROLISIS DENGAN ENZIM MURNI

Jam	Hidrolisis Enzim Murni							
	A1	A2	A3	A	Konsentrasi	Konsentrasi gula/unit	Massa Gula	Yield
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,384	0,384	0,384	0,384	5,512	0,296	0,110	0,188
24	0,445	0,446	0,446	0,446	6,397	0,344	0,128	0,218
36	0,586	0,586	0,586	0,586	8,411	0,452	0,168	0,286
48	0,655	0,653	0,655	0,654	9,392	0,505	0,188	0,320

Jam	Hidrolisis Enzim Murni Terimobilisasi Chitosan							
	A1	A2	A3	A	Konsentrasi	Konsentrasi gula/unit	Massa Gula	Yield
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,102	0,102	0,102	0,102	1,464	0,022	0,029	0,050
24	0,074	0,074	0,074	0,074	1,062	0,016	0,021	0,036
36	0,098	0,098	0,098	0,098	1,407	0,021	0,028	0,048
48	0,134	0,134	0,134	0,134	1,923	0,029	0,038	0,065

Jam	Hidrolisis Enzim Murni Terimobilisasi Chitosan-GDA							
	A1	A2	A3	A	Konsentrasi	Konsentrasi gula/unit	Massa Gula	Yield
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,135	0,135	0,135	0,135	1,938	0,038	0,051	0,086
24	0,137	0,137	0,137	0,137	1,962	0,091	0,122	0,207
36	0,135	0,135	0,135	0,135	1,938	0,088	0,118	0,201
48	0,182	0,182	0,182	0,182	2,612	0,073	0,097	0,165

A-10
PERHITUNGAN RETAINED ACTIVITY

Jenis Enzim	Units	Hidrolisis Run-1						
		Konsentrasi	Gula (gr/unit)	mol (μmol)	Waktu (min)	μmol/min	Protein (mg)	Specific activity
Chitosan	39,574	0,021	0,0005198	2,8881	2880	0,0010028	11,84	0,000085
Chitosan-GDA	39,574	0,033	0,0008438	4,6881	2160	0,0021704	41,72	0,000052
Crude	18,6	0,103	0,0055376	30,7646	2160	0,0142429	188	0,000076

Jenis Enzim	Units	Hidrolisis Run-2							
		Konsentrasi	Gula (gr/unit)	mol (μmol)	Waktu (min)	μmol/min	Protein (mg)	Specific activity	Retained Activity (%)
Chitosan	39,574	0,016	0,000392	2,1761	2880	0,000756	11,84	0,000064	75,35
Chitosan-GDA	39,574	0,026	0,000646	3,5866	2160	0,001660	41,72	0,000040	76,50

A-11
PERHITUNGAN BRADFORD ENZIM CRUDE

Jenis enzim	Konsentrasi NaCl (ml)	Konsentrasi enzim (ml)	Absorbansi				Slope	Konsentrasi (mg/ml)	Volume (ml)	Total protein (mg)	Protein terabsorb (mg)
			A1	A2	A3	A					
Selulase	0,05	0,05	0,222	0,223	0,222	0,222	1,313	5,840	32,2	188,04	11,84
Chitosan	0,05	0,05	0,207	0,208	0,21	0,208	1,313	5,472	32,2	176,20	
Selulase	0,05	0,05	0,222	0,223	0,222	0,222	1,313	5,840	32,2	188,04	41,72
Chitosan-gda	0,05	0,05	0,174	0,173	0,172	0,173	1,313	4,544	32,2	146,31	
Sebelum purifikasi	0,05	0,05	0,193	0,196	0,194	0,194	1,313	5,104	400	2041,7	584,86
Setelah purifikasi	0,05	0,05	0,138	0,139	0,139	0,139	1,313	3,642	400	1456,8	

A-12
PERHITUNGAN BRADFORD ENZIM MURNI

Jenis enzim	Konsentrasi NaCl (ml)	Konsentrasi enzim (ml)	Absorbansi				Slope	Konsentrasi (mg/ml)	Volume (ml)	Total Protein (mg)	Protein Terabsorb (mg)
			A1	A2	A3	A					
selulase	0,05	0,05	0,289	0,289	0,285	0,288	1,313	7,556	20,0	151,11	52,357
chitosan 1	0,05	0,05	0,187	0,187	0,19	0,188	1,313	4,938	20,0	98,76	
selulase	0,05	0,05	0,289	0,289	0,285	0,288	1,313	7,556	20,0	151,11	56,034
chitosan 2	0,05	0,05	0,183	0,18	0,18	0,181	1,313	4,754	20,0	95,08	
selulase	0,05	0,05	0,289	0,289	0,285	0,288	1,313	7,556	20,0	151,11	38,348
chitosan -gda 1	0,05	0,05	0,125	0,122	0,121	0,123	1,313	3,222	35	112,76	
selulase	0,05	0,05	0,289	0,289	0,285	0,288	1,313	7,556	20,0	151,11	36,86
chitosan -gda 2	0,05	0,05	0,175	0,172	0,175	0,174	1,313	4,570	25	114,25	

A-13

PERHITUNGAN AKTIFITAS ENZIM

Jenis Enzim	Absorbansi		Absorbansi (A2-A1)	Slope	Konsentrasi ($\mu\text{mol/ml}$)	Waktu Inkubasi (min)	Aktifitas ($\mu\text{mol/min}$)	Volum Total (ml)	Aktifitas Total (units)
	A1	A2							
Selulase 1	0,271	0,099	0,172	71,694	12,331	10	1,23	64,4	79,2
Selulase 2	0,229	0,006	0,223	71,694	15,988	10	1,60	11,6	18,6
Selulase 3	0,267	0,043	0,224	71,694	16,059	10	1,61	400	644
Selulase 4	1,286	0,937	0,348	71,694	24,950	10	2,49	5,5	13,7
Selulase 5	0,753	0,287	0,466	71,694	33,409	10	3,34	5,5	18,6

Keterangan:

selulase 1 = enzim crude selulase untuk imobilisasi

selulase 2 = enzim crude selulase untuk hidrolisis

selulase 3 = enzim crude selulase sebelum pemurnian

selulase 4 = enzim crude selulase setelah pemurnian

selulase 5 = enzim selulase murni

(Halaman ini sengaja dikosongkan)

BIODATA PENULIS 1



Gek Ela Kumala Parwita, lahir di Denpasar tanggal 17 Desember 1992, merupakan putri pertama dari pasangan Bapak Putu Warnita dan Ibu Ni Wayan Martini. Penulis menempuh pendidikan formal dari SDN 05 Tonja Denpasar Bali, SMP Negeri 1 Denpasar dan SMA Negeri 3 Denpasar. Pada saat SMP, penulis masuk pada kelas internasional dimana penulis melalui *double degree curriculum*. Setelah lulus dari SMA,

penulis melanjutkan studi di Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS untuk jenjang Strata I. Pada akhir studi, penulis mengerjakan Tugas Pra Desain “**Pabrik Hexamethylene Tetramine dari Ammonia dan Formaldehid dengan Proses Meissner**”. Penulis melakukan Tugas Akhir di Laboratorium Teknologi Biokimia di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng. Dengan penulisan skripsi ini, penulis berharap agar buku skripsi ini bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi.

Nama : Gek Ela Kumala Parwita

TTL : Denpasar, 17 Desember 1992

Alamat : Jl Nangka Utara Gg Kiwi No 16 Denpasar

Email : gekelakumala@gmail.com

BIODATA PENULIS 2



Dwi Ramadhani, lahir di Jakarta tanggal 7 Maret 1993, merupakan putri kedua dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Handi Handoko dan Ibu Retno S Dewi. Penulis menempuh pendidikan formal dari SDN 03 Pagi Semper Barat di Jakarta Utara, SMP RSBI 30 Jakarta Utara dan SMA di SMA 13 Jakarta Utara. Pada saat SMA, penulis masuk pada kelas internasional dimana penulis melalui *double degree curriculum* yakni dari kurikulum reguler dan kurikulum Cambridge. Setelah lulus dari SMA, penulis melanjutkan studi di Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS untuk jenjang Strata I. Penulis memiliki hobi bermain musik, berenang, menyanyi, melukis dan kuliner. Pada akhir studi, penulis mengerjakan Tugas Pra Desain “**Pabrik Hexamethylene Tetramine dari Ammonia dan Formaldehid dengan Proses Meissner**”. Penulis melakukan Tugas Akhir di Laboratorium Teknologi Biokimia di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng. Dengan penulisan skripsi ini, penulis berharap agar buku skripsi ini bermanfaat bagi kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi.

Nama : Dwi Ramadhani

TTL : Jakarta, 7 Maret 1993

Alamat : Villa Gading Permai Blok I/10

Email : dwiramadhany@live.com